

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**DETECCIÓN DE *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* Y *Rickettsia rickettsii* EN
GARRAPATAS DE LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY MEDIANTE
PCR**

POR

MVZ. ALEJANDRA TAMEZ GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

JUNIO, 2018

**DETECCIÓN DE *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* Y *Rickettsia rickettsii* EN
GARRAPATAS DE LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY MEDIANTE
PCR**

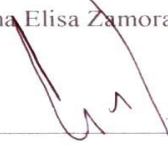
Dirección de Tesis



Dr. Jesús Jaime Escareño Hernández



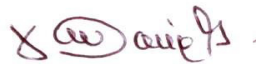
Dra. Diana Elisa Zamora Ávila



MC. Gustavo Moreno Degollado



Dr. Ramiro Ávalos Ramírez



Dr. Alfredo Wong González

**DETECCIÓN DE *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* Y *Rickettsia rickettsii* EN
GARRAPATAS DE LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY MEDIANTE
PCR**

Comité de Tesis

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño

Presidente

Dra. Diana E. Zamora Ávila

Secretario

MC. Gustavo Moreno Degollado

Vocal

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

Vocal

Dr. Alfredo Wong González

Vocal

**DETECCIÓN DE *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* Y *Rickettsia rickettsii* EN
GARRAPATAS DE LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY MEDIANTE
PCR**

Dirección de Tesis

Dr. Jesús Jaime Escareño Hernández

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila

MC. Gustavo Moreno Degollado

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

Dr. Alfredo Wong González

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi esposo Jorge por apoyarme en la decisión de emprender este proyecto, por motivarme, por los desvelos y sobre todo por caminar a mi lado. Te amo.

Mi papá, Roberto Tamez, que con su ejemplo me impulsa a ser la mejor versión de mi misma y dar el 100% en todo lo que hago.

Mi asesor el Dr. Jesús Jaime Hernández que gracias a sus conocimientos y la pasión con la que hace las cosas hizo posible la realización de este trabajo. Estaré eternamente agradecida por su tiempo, dedicación y haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su dirección.

A mis co-asesores MC. Gustavo Moreno, Dra. Diana Zamora, Dr. Ramiro Ávalos y Dr. Alfredo Wong por todo el apoyo y asesoría brindados para la realización de este proyecto.

A mis compañeras de laboratorio TLC. Cynthia Padrón y TLC. Leslee de la Rosa por su paciencia, su ingenio, su tiempo, sus conocimientos y su vocación a la ciencia. Este logro es de ustedes también. Las quiero.

A Yesie, Lulú y Lemy por ser mi fortaleza mental, por escucharme y aconsejarme a lo largo de la maestría, no dejarme tirar la toalla y mantenerme enfocada. No podría haberlo hecho sin ustedes.

A mis maestros con sus aportaciones y consejos para hacer mejor y más fácil este trabajo. Su conocimiento es invaluable para mí.

A mis compañeros Lucio, Yuri, Aimeé, Marcia, Claudia y Kenya por todos esos momentos compartidos a lo largo de estos 2 años.

A todos los médicos que me apoyaron con la recolección de muestras y datos.

A todos los compañeros: Luisa por quedarse a altas horas conmigo a esperar resultados, Dome por los consejos en los protocolos y compartir sus conocimientos, Ángel por su apoyo en la identificación de las garrapatas, Lore con su actitud positiva y motivación.

ÍNDICE

ÍNDICE	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Vector	17
2.1.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	20
2.1.2 <i>Dermacentor variabilis</i>	24
2.2 <i>Ehrlichia canis</i>	26
2.3 <i>Rickettsia rickettsii</i>	30
2.4 <i>Borrelia burgdorferi</i>	34
2.5 Co-infecciones	38
3. JUSTIFICACIÓN	39
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVO	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 Área de estudio	42
6.2 Muestreo	43
6.3 Encuesta	44
6.4 Identificación de las garrapatas	44
6.5 Extracción de ADN	45
6.5.1 Cuantificación de ADN	45

6.5.2 Análisis de productos de extracción de ADN	46
6.6 PCR.....	46
6.6.1 Análisis de productos de PCR.....	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Área de Estudio	49
7.2 Muestreo	49
7.3 Encuestas	50
7.4 Identificación de las garrapatas	53
7.5 Extracción ADN de las garrapatas.....	56
7.5.1 Cuantificación de ADN.....	56
7.5.2 Análisis de productos de PCR.....	57
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	21
Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>Dermacentor variabilis</i>	24
Tabla 3. Clasificación taxonómica <i>Ehrlichia canis</i>	26
Tabla 4. Clasificación taxonómica <i>Rickettsia rickettsii</i>	31
Tabla 5. Clasificación taxonómica <i>Borrelia burgdorferi</i>	34
Tabla 6. Muestras obtenidas por municipio.....	49
Tabla 7. Garrapatas encontradas en la zona metropolitana de Monterrey.....	53
Tabla 8. Pools.....	57
Tabla 9. Muestras individuales.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de 3 hospedadores.	18
Figura 2. Bacterias presentes en el microbioma de las garrapatas.	20
Figura 3. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> o garrapata marrón del perro.	22
Figura 4. <i>Dermacentor variabilis</i> o garrapata americana del perro.....	25
Figura 5. Ciclo de <i>Ehrlichia canis</i> dentro de la célula.....	29
Figura 6. Lesiones en la espalda de un paciente con Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas.....	33
Figura 7. Ciclo de <i>Borrelia burgdorferi</i>	36
Figura 8. Eritema migrans en pacientes con enfermedad de Lyme.....	37
Figura 9. Municipios muestreados de la zona metropolitana de Monterrey.....	42
Figura 10. Género de perros muestreados.....	50
Figura 11. Tipo de pelaje de los perros muestreados.....	50
Figura 12. Talla de los perros muestreados.....	51
Figura 13. Tipo de piso donde viven los perros muestreados.....	51
Figura 14. Grado de infestación de los perros muestreados.....	52
Figura 15. Edad de los perros muestreados.....	52
Figura 16. Programas preventivos utilizados por los dueños de los perros muestreados.....	53
Figura 17. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Hembra.....	54
Figura 18. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Macho.....	54

Figura 19. <i>Dermacentor variabilis</i> . Hembra.....	55
Figura 20. <i>Dermacentor variabilis</i> . Macho.....	55
Figura 21. ADN de las extracciones de garrapatas con la técnica fenol-cloroformo.....	56
Figura 22. Cuantificador y kit utilizados para cuantificar ADN.....	56
Figura 23. Amplificación de ADN de <i>Ehrlichia canis</i>	58
Figura 24. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia rickettsii</i>	58
Figura 25. Amplificación de ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i>	58

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

μm	Micra
μl	Microlitro
°C	Grados centígrados
ADN	Acido Desoxirribonucleico
CDC	Center for Disease Control/ Centro de Control de Enfermedades
CME	Ehrlichiosis Monocitotrópica Canina
HME	Ehrlichiosis Monocitotrópica Humana
ml	mililitro
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
s/d	sin datos

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas son un problema de salud pública que requiere estrategias para su control y prevención, mediante el uso de herramientas de vigilancia epidemiológica por lo que se ha planteado en este trabajo detectar y cuantificar mediante PCR la presencia de *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, y *Borrelia burgdorferi* en garrapatas de Monterrey y su zona metropolitana. Se recolectaron un total de 421 muestras de perros que acudieron a una clínica veterinaria y otros de centros de control animal, de las cuales el 98.81% (416) resultaron ser *Rhipicephalus sanguineus* y el 1.18% (5) restante *Dermacentor variabilis*. De las muestras analizadas por PCR resultaron positivas a *Ehrlichia canis* un 52.73% (222), a *Rickettsia rickettsii* 8.07% (34) y para *Borrelia burgdorferi* ninguna resulto positiva. También se encontró co-infección de *E.canis* y *R. rickettsii* en un 4.75% de las garrapatas.

ABSTRACT

Tick-borne diseases are a public health issue that needs to be addressed using efficient epidemiologic strategies for its control and prevention. The aim of this study is to detect and quantify the prevalence of *E. canis*, *R. rickettsii* and *B. burgdorferi*, in ticks collected in Monterrey and its metropolitan area, using PCR. 421 samples were collected from dogs with owners and from dogs from shelters; 98.81% (416) were identified as *Rhipicephalus sanguineus* and 1.18% (5) as *Dermacentor variabilis*. The samples resulting positive to *Ehrlichia canis* 52.73% (222), to *Rickettsia rickettsii* 8.07% (34) and none of the samples turned out positive for *Borrelia burgdorferi*. Also co-infection with *E. canis* and *R. rickettsii* was found in 4.75% of the ticks collected.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores, es un grupo de padecimientos, que son causados por múltiples patógenos transmitidos por artrópodos, tales como mosquitos, pulgas, piojos y garrapatas. El correcto manejo de estas enfermedades es de mucha importancia tanto en medicina humana como en veterinaria, dado que estas enfermedades son transmisibles a humanos y perros, los cuales generalmente viven en estrecho contacto (Dantas-torres, 2015).

Los perros además de ser susceptibles a enfermedades transmitidas por garrapatas, pueden fungir como reservorios para patógenos humanos, siendo el huésped definitivo para la alimentación de las garrapatas, como transporte mecánico de las garrapatas y como indicadores de riesgo de infección en determinada zona geográfica. Es importante, tanto para perros como para humanos, el monitoreo, diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Fritz, 2009).

Las rickettsiosis son un grupo de infecciones bacterianas que desde el punto de vista clínico están estrechamente relacionadas, ya que su sintomatología suele ser muy similares entre ellas. (SINAVE, 2015).

Las garrapatas ocupan actualmente el segundo lugar como vectores de patógenos que provocan enfermedades en humanos y animales (Beugnet & Marie, 2009).

Las garrapatas son artrópodos del orden *Arachnida*. Viven libremente pero requieren de alimentarse de sangre al menos en una de las etapas de su ciclo de vida. Se alimentan en diferentes huéspedes lo que permite el paso de patógenos de un hospedador a otro. El riesgo de transmitir la enfermedad se determina por la prevalencia de garrapatas infectadas, y las probabilidades de contacto entre una garrapata infectada y un huésped susceptible (Fritz, 2009).

Se han registrado cien especies diferentes de garrapatas en México, lo que significa un 11.3% de la diversidad mundial conocida. En nuestro país esta diversidad está constituida por 2 familias: *Argasidae* que son garrapatas blandas e *Ixodidae* que son garrapatas duras. Los argásidos están constituidos por 32 especies que se dividen en 5 géneros: *Argas* con 6 especies, *Antricola* con 3, *Ornithodoros* con 20, *Otobius* con 2 y *Nothoaspis* con 1, mientras que los *Ixodidae* representados por 68 especies divididos en 5 géneros: *Ixodes* con 26 especies, *Amblyomma* con 26, *Dermacentor* con 10, *Haemaphysalis* con 3 y *Rhipicephalus* con 3 (Pérez, Guzmán-cornejo, Montiel-parra, & Gerardo, 2014).

Rhipicephalus sanguineus, la garrapata marrón del perro, es la garrapata con mayor distribución mundial, parasitando tanto humanos como perros (Levin, Gray, Dantas-torres, & Estrada-pe, 2013).

Los perros predisponen a diferentes enfermedades transmitidas por garrapatas, incluyendo miembros de la familia *Anaplasmataceae* (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*), *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii* (Scorpio et al., 2008).

En Texas, las enfermedades causadas por *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., y *Ehrlichia* spp., son diagnosticadas con menos frecuencia que en otras zonas de Estados Unidos, sin embargo, se ha documentado la presencia de estas bacterias y se han encontrado garrapatas de las especies que tienen capacidad de portar y transmitir estos patógenos, en distintas áreas de Texas (Mitchell et al., 2016)

En Sudamérica, distintas rickettsias han sido detectadas como por ejemplo *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. massiliae* y *R. felis*, así como ehrlichias incluidas *Ehrlichia chaffeensis* y *E. canis*, que han sido asociadas a cuadros clínicos presentes en humanos. Se han descrito también otras especies en garrapatas y en hospedadores variados (Cicuttin, Vidal, De Salvo, Beltrán, & Gury, 2014).

2. ANTECEDENTES

Las garrapatas transmiten más patógenos que ningún otro grupo de artrópodos a nivel mundial, afectando humanos, ganado y animales de compañía. Las enfermedades transmitidas por garrapatas se reconocen desde la segunda mitad del siglo 19 y representan el grupo de enfermedades transmitidas por artrópodos que se está expandiendo con mayor rapidez.

El mayor impacto por las enfermedades transmitidas por garrapatas se dio en Europa y América del Norte cuando se identificó *Borrelia burgdorferi* como el causante de la enfermedad de Lyme en 1980, así como su importancia médica, amplia distribución y alta prevalencia. Desde entonces el número de enfermedades transmitidas por garrapatas ha aumentado dramáticamente. Desde 1984 se han descrito más de 10 nuevas especies patógenas de *Rickettsia spp.* y el número de enfermedades de reporte obligatorio en Estados Unidos aumento de 2 en 1990 a 5 en 1998.

El orden Rickettsiales comprende bacterias intracelulares Gram negativas que infectan células eucariotas. Consiste de 2 familias: Rickettsiaceae y Anaplasmataceae. La familia Rickettsiaceae está integrada por los generos *Rickettsia* y *Orientia*, que ocupan el espacio intracitoplasmático del hospedador; mientras que la familia Anaplasmataceae la integran los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* que ocupan un compartimento intravacuolar dentro de las células infectadas. Se han desarrollado muchos protocolos de PCR para la detección de miembros de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* utilizando el gen 16S rRNA. Pero cual sea que sea el protocolo utilizado una vez que el género sea detectado, se tienen que realizar PCR adicionales para determinar la especie. Este es el caso de los primers diseñados para *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* y *E. ewingii*, que pueden ser identificados utilizando como secuencia el producto de 479pb generados con los oligonucleótidos ECC y ECB. También se ha utilizado lo genes groEl y gltA, que ya ha sido validado para identificar *Rickettsia spp* y *Bartonella spp*. En cuanto a las Rickettsiaceae, Roux analizó y comparo diferentes secuencias gltA de diferentes especies de *Rickettsia*. También comparo gltA con el gen 16S rRNA y concluyeron que el gltA está menos conservado en rickettsias. Esto sugiriendo que es de alto valor para diferenciar entre especies de este género (Guillemi, Tomassone, & Farber, 2015).

En medida que las ciudades se sigan expandiendo y las poblaciones se acercan cada vez a zonas rurales, invadiendo lugares como bosques o tierras destinadas a la agricultura, las posibilidades de exposición a enfermedades transmitidas por garrapatas aumentan, debido al contacto entre humanos, animales silvestres y animales domésticos (Pfäffle, Littwin, Muders, & Petney, 2013).

2.1 Vector

Las garrapatas son parásitos externo de distribución mundial, son hematófagos obligados y pueden fungir como reservorio o vector de enfermedades como hongos, protozoa, virus y bacterias durante su alimentación de un huésped. Las garrapatas ocupan el segundo lugar como vectores de enfermedades en humanos, solo detrás de los mosquitos, y el primer lugar en animales. La saliva de la garrapata es la principal vía en la que los patógenos llegan al torrente sanguíneo del huésped. La distribución de enfermedades rickettsiales varía de acuerdo a la densidad y distribución de los vectores y los huéspedes, así como las interacciones entre estos (Brites-neto, Maria, Duarte, & Martins, 2015).

Existen muchas especies de garrapatas que son capaces de transmitir patógenos a los humanos y a los animales. Debido a que la relación entre las garrapatas y los patógenos que pueden transmitir puede variar, es necesario entender las dinámicas que involucran las poblaciones de garrapatas en una zona determinada. Tener esta información nos provee de una importante herramienta para detectar amenazas a la salud pública, que no necesariamente apliquen para otras regiones (Hudman & Sargentini, 2016)

Existen 2 familias de garrapatas: *Argasidae* (las garrapatas blandas) e *Ixodidae* (las garrapatas duras). Los argásidos se representan en 5 géneros: *Argas*, *Antricola*, *Ornithodoros*, *Otobius* y *Nothoaspis*, y los 5 géneros de *Ixodidae* son: *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus* (Pérez et al., 2014).

Los miembros de la familia *Argasidae* (Canestrini, 1890) tienen ciclos de vida que involucran múltiples huéspedes, el apareamiento y fecundación ocurren en el ambiente y no en huésped, y tienen varias oviposiciones entre tomas de sangre para su alimentación (Figura 1). Los de la familia *Ixodidae* (Murray, 1844) tienen dimorfismo sexual muy marcado, el borde posterior del epistoma se puede dividir en estructuras esclerotizadas, parasitan múltiples huéspedes (pueden parasitar de 1 a 3 huéspedes) y hay etapas en su ciclo que se desarrollan en el ambiente, lo que les da la capacidad de transmitir enfermedades entre humanos y animales (Brites-neto et al., 2015).

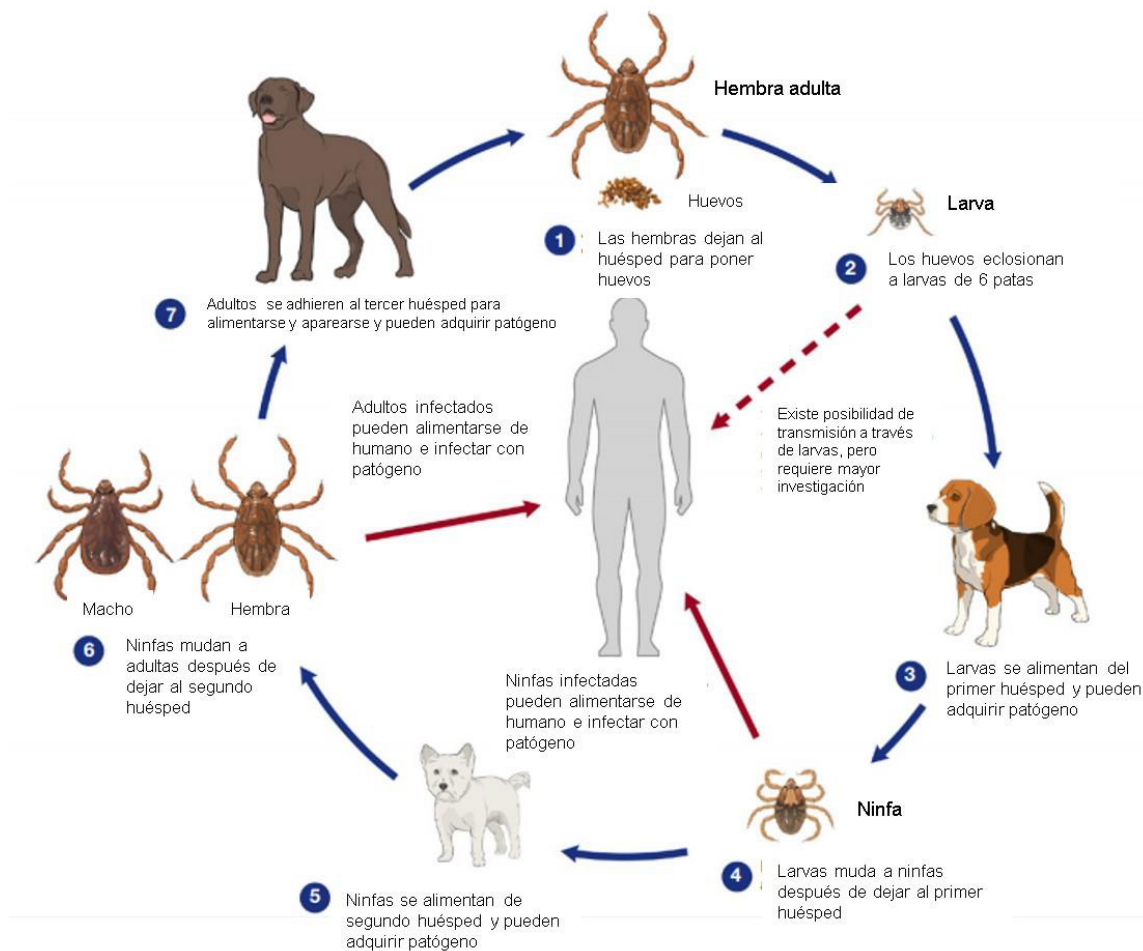


Figura 1. Ciclo de 3 hospedadores. CDC, 2017.

Las fases de desarrollo que se dan sobre el huésped se llaman fase de ingurgitación y las que se dan en el ambiente se denominan de ayuno. Las fases de ayuno son las que tienen mayor proporción en la vida de las garrapatas y pueden sobrevivir la desecación y estar sin alimento por más tiempo que ningún otro artrópodo (Fielden, Jones, Goldberg, & Rechav, 1999).

La lista de patógenos que pueden ser transmitidos por garrapatas cada día va en aumento, en parte gracias al cambio de las condiciones climáticas alrededor del mundo, por ello existe una urgencia en el desarrollo de estrategias para controlarlas, prevenir la infección y de esa manera mermar la transmisión de enfermedades transmitidas por garrapatas.

El patógeno entra al intestino de la garrapata cuando la larva realiza su primer alimentación de un vertebrado infectado y como en el caso de *B. burgdorferi*, sale del intestino para colonizar las glándulas salivales; una vez que la larva de garrapata está infectada, el patógeno se mantiene durante todas las etapas de su vida, ninfa y adulta, por lo que se considera que las garrapatas están infectadas de por vida. .

Las garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* y *Dermacentor* han demostrado ser capaces de portar diferentes patógenos al mismo tiempo, tanto en ovarios como en glándulas salivares, y se ha demostrado que los vertebrados mordidos por estas garrapatas, resultan seropositivos a más de una de estas bacteria (Figura 2) (Narasimhan & Fikrig, 2015).

La alimentación de los artrópodos en base a sangre de vertebrados, es un proceso clave para la transmisión de patógenos. Debido a que el intestino representa la interfase entre el vector y el patógeno, el entendimiento de este proceso nos podría dar pautas para el control de estas enfermedades.

En las garrapatas duras, la alimentación incluye una sola toma de sangre por etapa de vida y las hembras mueren días después de la oviposición. Las hembras se alimentan por 6-9 días, luego viene un periodo de engordamiento rápido en 12-24 horas, que representa dos tercios del volumen final de sangre que consumen antes de soltarse. Solo las hembras que se han apareado

presentan esta etapa de ingurgitación rápida, lo que sugiere que algún mecanismo hormonal debe de regir este período de alimentación rápida (Sojka et al., 2013).

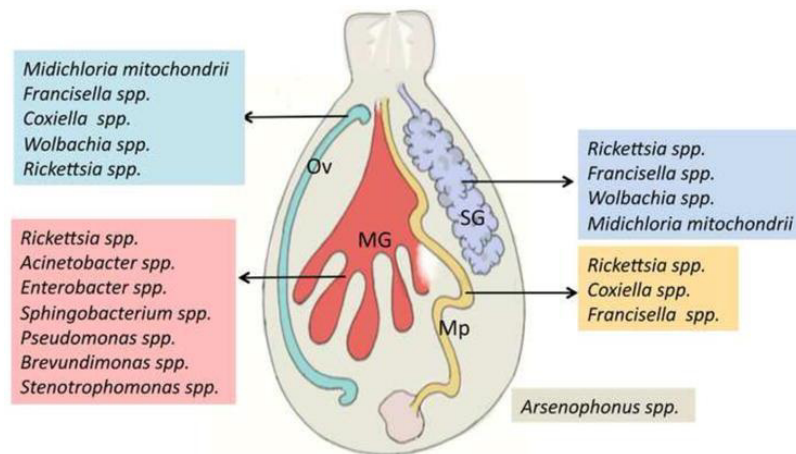


Figura 2. Bacterias presentes en el microbioma de las Garrapatas. Glándulas Salivales (SG), Intestinos (MG), Ovarios (Ov) y tubulos de Malpighi (Mp). (Narasimhan, 2015)

Los patógenos atraviesan múltiples barreras para pasar de un hospedador a otro. La primera es el intestino de la garrapata, en donde el contenido luminal podría ser potencialmente peligroso. Después existe una barrera física que deben traspasar. Si esta barrera se traspasa, la hemolinfa del vector también podría contener elementos inmunes que podrían dañar al patógeno. Después sigue una barrera física más: el epitelio de las glándulas salivales de la garrapata, que una vez que llegue ahí, tiene que soportar los químicos presentes en la saliva y de esa manera poder llegar a su próximo huésped. La saliva de las garrapatas facilita la transmisión de patógenos en lugar de atenuarla, los elementos presentes en la saliva, permiten el flujo de sangre entre la garrapata y el hospedador (Reuben Kaufman, 2010).

2.1.1 *Rhipicephalus sanguineus*

De entre los todos los animales domésticos los perros siempre han aparecido al lado de los humanos y debido a la devoción que muestran a sus dueños y su personalidad amigable han

representado la mascota perfecta a través de la historia. Debido a esta estrecha relación, los perros y los humanos comparten muchas cosas, entre ellas enfermedades zoonóticas y ectoparásitos.

Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	
REINO	Animalia
FILO	Arthropoda
CLASE	Arachnida
ORDEN	Ixodida
FAMILIA	Ixodidae
GENERO	<i>Rhipicephalus</i>
ESPECIE	<i>R. sanguineus</i>

Dentro de los artrópodos que comparten perros y humanos, la garrapata marrón de perro *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 3) es un vector eficiente en la transmisión de diversos patógenos (Otranto, Huchet, Giannelli, Callou, & Dantas-Torres, 2014).

Rhipicephalus sanguineus sensu stricto fue descrito de manera muy básica por primera vez como *Ixodes sanguineus* por Latreille en 1806 (Dantas-Torres & Otranto, 2015). Recientemente el estado taxonómico de la garrapata marrón del perro, a la que siempre se le había referido como *R. sanguineus* se encuentra en debate (Tabla 1). En la actualidad el género *Rhipicephalus* contiene más de 70 especies pero ninguna con una distribución tan amplia como la garrapata marrón del perro.

Se han utilizado guías morfológicas y secuenciación genética mitocondrial que demuestran que el complejo de *R. sanguineus* que parasitan perros en Europa, Asia, Suramérica y Oceanía incluye distintas unidades taxonómicas. Actualmente las dos poblaciones conocidas se refieren como *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Rssl) linaje tropical y Rssl linaje templado (Jones,

Gruntmeir, Hamer, & Little, 2017). Esta garrapata fue introducida a Suramérica y se registró por primera vez en Brasil al inicio del siglo 20 (Caetano et al., 2017).

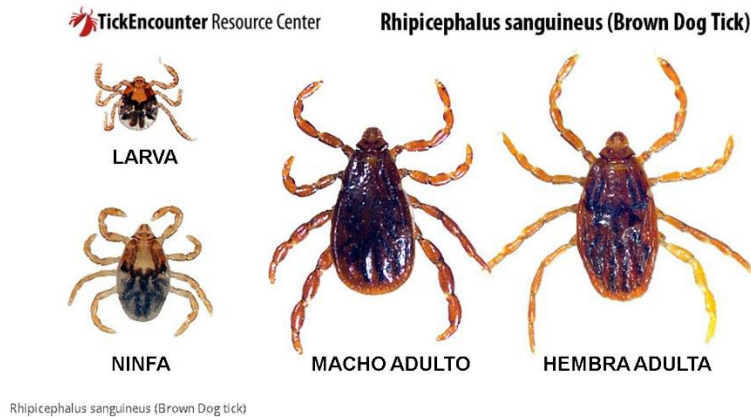


Figura 3. *Rhipicephalus sanguineus* o Garrapata Marrón del perro. (Tick Encounter Resource Center, 2017)

La garrapata marrón del perro tiene distribución mundial debido a la ubicuidad de su hospedador primario: el perro doméstico. Globalmente se ha reconocido esta garrapata de actuar como vector de *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia massiliae* y *Rickettsia rickettsii* pero hay diferencias en el comportamiento y la habilidad de estas poblaciones para transmitir estos patógenos a los perros y a los humanos y no todos sus ciclos han podido ser confirmados por completo (Dantas-Torres & Otranto, 2015).

Esta garrapata tiene la habilidad de mantener al patógeno en la naturaleza, a través de varias generaciones, vía transovárica (de la hembra a su progenie) y transestadial (a través de las diferentes mudas en su ciclo de vida) (Dantas-Torres, 2008)

R. sanguineus puede sobrevivir tanto en interior como en exteriores y puedes ser activas todo el año, aunque generalmente los meses más cálidos del año es cuando presentan mayor actividad (Little, 2010).

En cada etapa de su desarrollo, tiene un hospedador diferente por lo que tiene un ciclo de tres huéspedes, uno por cada etapa: larva, ninfa y adulta. Las hembras se alimentan de 5 a 21 días, cuando la etapa de “engordamiento” termina se suelta del huésped para digerir la sangre y poner sus huevos, la oviposición toma en promedio 16-18 días. Las hembras ponen alrededor de 4000 huevos. La temperatura ideal para la oviposición es entre 20-30°C y al terminar la hembra muere. Los huevos los depositan en grietas, generalmente cerca del lugar donde el huésped acostumbra descansar, para que las larvas al eclosionar no tengan dificultad para encontrar un huésped del cual alimentarse. El período de incubación que requieren los huevos es de 6 a 23 días. En condiciones favorables el ciclo puede completarse en 63-91 días (Dantas-Torres, 2008).

R. sanguineus se clasifica como endófila (que habita madrigueras o refugios artificiales) o bien en los alrededores donde habitan sus hospedadores. Se cree que en un principio habitaba las madrigueras de carnívoras como zorras y mustélidos, y después de la domesticación de los perros, adoptó el hábitat de estos y se adaptó a las viviendas humanas, es por ello que tiene la mayor distribución geográfica de todas las especies de garrapatas, viviendo dentro de casa de los humanos. Esto debido a la impresionante capacidad de adaptación de la garrapata y además debido a la evolución que ha llevado a la par de la domesticación del perro.

Se encuentra principalmente en zonas urbanas y suburbanas, en donde vive en estrecho contacto con perros y humanos. En estas zonas generalmente se presentan infestaciones severas, sobre todo en perros que se encuentran confinados a espacios reducidos y que no son tratados regularmente con ectoparasiticidas. Es menos probable encontrarla en zonas rurales que en las zonas urbanas y suburbanas, probablemente debido a que en estas zonas a los perros les permite desplazarse de un lugar a otro.

R. sanguineus está adaptada a ambientes muy secos, ya que es muy eficiente en retener agua. Además en todas las etapas de vida, excepto los huevos, pueden absorber vapor de agua del aire y tomando agua libre (Levin et al., 2013)

2.1.2 *Dermacentor variabilis*

El género *Dermacentor* (Koch, 1844) se puede describir como garrapatas que tienen ojos y pliegues presentes, la base del capítulo de forma sub- rectangular, tiene antenas cortas y gruesas y un escudo dorsal de ornato. La mayoría de las especies tiene ciclos de tres hospedadores. Los adultos generalmente se alimentan de mamíferos de tamaño mediano a grande, mientras que las etapas inmaduras se alimentan de mamíferos pequeños. Las especies que tienen ciclos de 2 y 3 hospedadores son de relevancia, ya que tienen un papel clave en la transmisión de enfermedades entre humanos y animales domésticos y salvajes. En el hemisferio occidental se conocen 14 géneros de *Dermacentor*, en México se han reportado 9 de estos, entre ellos *variabilis* (Tabla 2) (Say) (Guzmán-Cornejo et al., 2016).

Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>Dermacentor variabilis</i>	
REINO	Animalia
FILO	Arthropoda
CLASE	Arachnida
ORDEN	Ixodida
FAMILIA	Ixodidae
GENERO	<i>Dermacentor</i>
ESPECIE	<i>D. variabilis</i>

Las garrapatas *Dermacentor spp.* tienen una tasa reproducción muy alta, un ciclo de desarrollo muy rápido, algunas de ellas pueden sobrevivir incluso debajo del agua por muchos meses y en temperaturas muy bajas comparadas con otros géneros de garrapatas, su rango de huéspedes incluye más de 60 especies silvestres y domésticas (Földvári, Šíroký, Szekeres, Majoros, & Sprong, 2016).

Las larvas y las ninfas utilizan mamíferos pequeños para alimentarse como ardillas y ratones de campo, mientras que los adultos se alimentan de mamíferos de medianos a grandes como lo son perros, mapaches, zorrillos, caballos y ganado (Dergoussoff & Chilton, 2007).

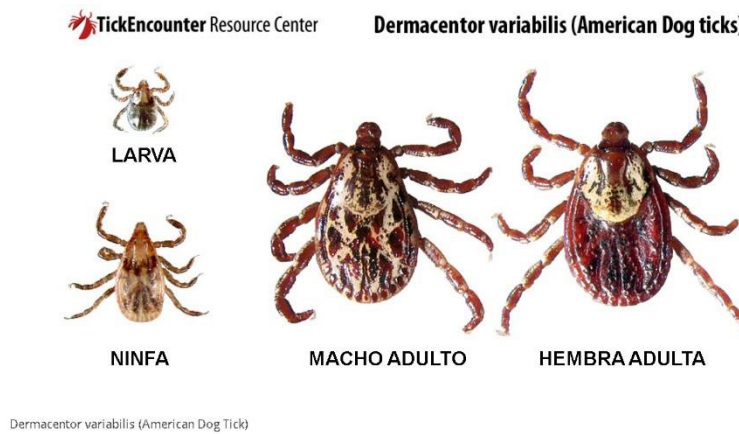


Figura 4. *Dermacentor variabilis* o Garrapata Americana del perro (Tick Encounter Resource Center, 2017)

En un estudio realizado para analizar el ciclo de vida de *Dermacentor variabilis* (Figura 4) se determinó que el ciclo completo tiene una duración aproximada de 176 a 191 días, las larvas se alimentan por 2 a 8 días y posteriormente se bajan del huésped y la muda hacia ninfa dura entre 13 y 35 días, ya en la etapa de ninfa se alimenta de 4 a 11 días y se libera del huésped para madurar a adulto lo que toma entre 26 a 35 días. Las hembras se alimentan por 6 a 12 días y se bajan del huésped para pasar la gestación de los huevos en el ambiente, este período dura de 10-24 días. El tiempo de duración de alimentación de los machos es desconocido, ya que pueden permanecer unidos al huésped por un periodo prolongado. La incubación de los huevos tarda de 37 a 49 días (Troughton & Levin, 2007)

Dermacentor variabilis es el principal vector de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (Brites-neto et al., 2015). Por lo tanto la incidencia de esta enfermedad, está directamente asociada a la distribución del hospedador del vector y/o reservorios asociados a esta (Raele, Galante, Pugliese, Salandra, & Cafiero, 2017). Experimentalmente también se ha logrado que ésta garrapata que pueda transmitir *Ehrlichia canis* (Little, 2010).

2.2 Ehrlichia canis

Ehrlichia primeramente fue asociada a una enfermedad veterinaria en Africa por Cowdry en 1925, quien identifico *Ehrlichia ruminatum* en el ganado, una década después la enfermedad fue identificada por Donatien y Lestoquard en Algeria en 1935. Más tarde alrededor de 1970, comenzó a recibir mayor atención debido a que un gran número de perros militares, sobre todo pastores alemanes, murieron de esta enfermedad durante la guerra de Vietnam. La ehrlichiosis monocitotrófica canina es una enfermedad importante de los perros y tiene distribución mundial. Esta enfermedad es causada por el agente etiológico *Ehrlichia canis*, una bacteria con una delgada membrana ondulante, consiste de un solo cromosoma circular que consiste en 1,315,030 nucleótidos (Harrus & Waner, 2011).

Tabla 3. Clasificación taxonómica <i>Ehrlichia canis</i>	
REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Alfa proteobacteria
ORDEN	Rickettsiales
FAMILIA	Anaplasmataceae
GENERO	<i>Ehrlichia</i>
ESPECIE	<i>E. canis</i>

Ehrlichia pertenece a la orden de *Rickettsiales*, la cual incluye a la familia *Anaplasmataceae* (Tabla 3). A esta familia pertenecen los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* y *Neorickettsia* (Rar & Golovljova, 2011). El género *Ehrlichia* contiene 6 especies: *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *E. muris*, *E. ruminatum* y *E. mineirensis*, algunas de ellas con potencial zoonótico (Ismail & McBride, 2017).

La ehrlichiosis canina puede ser causada por *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* o una co-infección entre ellas o con otros patógenos transmitidos por garrapatas. *E. canis* fue el primero en ser descrito en perros y continua siendo el de mayor importancia debido a que tiene distribución mundial y provoca una enfermedad severa que pone en riesgo la vida. *E. chaffeensis* aunque también infecta perros causando cuadros leves de la enfermedad, es reconocida por provocar la Ehrlichiosis Monocitotrópica Humana (HME) en humanos. *E. ewingii* se ha demostrado que infecta tanto perros como humanos, principalmente cuando estos se encuentran inmunocomprometidos. Los vectores reconocidos en transmitir *Ehrlichia spp.* son: *R. sanguineus*, *D. variabilis* y *Amblyomma americanum* (Little, 2010)

Los miembros de la familia *Canidae*, sobre todo los perros domésticos pueden sufrir de Ehrlichiosis Monocitotrópica Canina (CME), causada por *E. canis* la cual es una rickettsia intracelular obligada (0.4-1.5µm) Gram negativa que invade y se desarrolla en monocitos y macrófagos de los caninos. (Ferrolho et al., 2016). Se replican en vacuolas en el citoplasma de las células del hospedador, formando microcolonias, llamadas mórulas (Ismail & McBride, 2017)

Varias especies de *Ehrlichia spp.* pueden tanto infectar como producir enfermedad en humanos como en perros, pero la infección con *E. canis* causa los cuadros clínicos más graves en perros puede resultar en fiebre, mialgia, depresión, bajo conteo de células blancas, trombocitopenia lo que desencadena desordenes hemorrágicos sobre todo sangrado de la nariz. Aunque es raro se ha reportado infección de *E. canis* en humanos en Venezuela. Los perros y caninos salvaje son los huéspedes naturales tanto de *E. canis* como de su principal vector la garrapata *R. sanguineus* (Nicholson, Allen, Mcquiston, Breitschwerdt, & Little, 2010).

Según la cronología de la aparición de los signos clínicos y anormalidades patológicas se puede clasificar la enfermedad en 3 fases: aguda, subclínica y crónica. En la fase aguda los signos pueden ser inespecíficos y variar de ligeros a severos: anorexia, depresión y fiebre, ocasionalmente petequias, equimosis y epistaxis. Los cambios hematológicos incluyen trombocitopenia y anemia y leucopenia leve. Generalmente el tratamiento adecuado en esta fase resulta en una recuperación completa, pero si el paciente no recibe tratamiento puede evolucionar

a la fase subclínica, la cual puede durar por años en la que el perro está aparentemente sano, aunque persiste una trombocitopenia leve durante esta fase. Los perros en esta fase pueden ser portadores de por vida y tener una recuperación espontánea o progresar a la fase crónica de la enfermedad. En esta fase se puede observar debilidad, depresión, emaciación y fiebre. Hematológicamente anemia, trombocitopenia y leucopenia severas debido a una producción deficiente en la médula ósea, y el pronóstico es grave (Shipov, Klement, Reuveni-Tager, Waner, & Harrus, 2008).

En la fase aguda es común encontrar signos oftalmológicos, los cuales en ocasiones son el único signo de la enfermedad. Los perros pueden presentar uveítis anterior, corioretinitis, papiledema, hemorragia retinal, infiltrados perivasculares en la retina y desprendimiento bulloso de la retina. Es común que presenten ceguera como resultado de la hiperviscosidad de la sangre que provoca hemorragias subretinales y desprendimiento (Harrus & Waner, 2011).

E. canis fue aislada y molecularmente caracterizada por primera vez en humanos asintomáticos en Venezuela en 1996, pero no se reconoció su potencial patógeno en aquel entonces. Fue hasta 2006 que se pudo aislar de pacientes humanos con sintomatología compatible con ehrlichiosis (fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, anorexia, depresión, letargia, náusea, vómito, pérdida de peso, trombocitopenia así como anormalidades en enzimas hepáticas), por lo que este patógeno se debe considerar en cuadros clínicos en pacientes que vivan en zonas endémicas de este microorganismo (Perez, Bodor, Zhang, Xiong, & Rikihisa, 2006).

La patogénesis de la enfermedad involucra a la bacteria que la produce directamente así como los mecanismos inmunes secundarios que este provoca. Las etapas del proceso de invasión incluyen adhesión, internalización y proliferación intracelular; seguido de exocitosis y propagación intercelular. Se sabe que *E. canis* es capaz de modular la respuesta inmune del hospedador (Harrus, 2015).

Ehrlichia canis existe dentro de la célula en dos formas ultraestructurales distintas: como célula condensada (0.4-0.6µm) y la forma reticulada (0.7-1.9µm). En la forma condensada son más pequeñas y tienen una cromatina densa, mientras que las reticuladas son más grandes y tienen filamentos nucleoides dispersos y ribosomas. La forma densa es la infecciosa y es la que promueve la internalización a la célula (Rar & Golovljova, 2011).

Su ciclo comienza con el estadio condensado de la bacteria adhiriéndose a la membrana de la célula, mediante endocitosis mediada por receptores. En el lapso de 1 hora después de entrar pasa a la etapa intermedia 1 (IM1) y después a su estado reticulado (RC). Durante las siguientes 48 horas se estará replicando, duplicando su población cada 8 horas. Después se transforma a la etapa intermedia 2 (IM2) y madura nuevamente a su estadio condensado, solo 72 horas después de haber entrado a la célula. Las etapas condensadas que se recolectan 72 horas post-infección han demostrado ser mucho más infectivas que las que se recolectan 24 horas post-infección (Figura 5) (McBride & Walker, 2011).

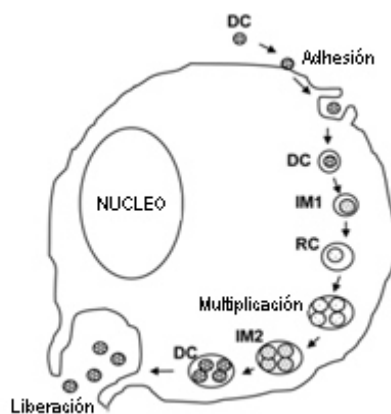


Figura 5. Ciclo de *Ehrlichia canis* dentro de la célula

Las tetraciclinas son los antibióticos de primera elección para el tratamiento de enfermedades transmitidas por garrapatas. Generalmente el protocolo recomendado para CME es de 10mg/kg por 4 semanas de doxiciclina vía oral, en la mayoría de los casos la respuesta es positiva aunque existen reportes de tratamientos de menor duración en la que pacientes pasan a la fase subclínica,

por lo que se recomiendan tratamientos más prolongados. La doxiciclina es una tetraciclina semi-sintética que ha tomado popularidad debido a sus propiedades pleiotrópicas independientemente de su actividad antimicrobiana. Tiene además propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias asociadas al efecto que tienen en la proliferación y función de leucocitos en sangre, síntesis de las citosinas y actividad de metaloproteinasas (MMP) (Villaescusa, García-Sancho, Rodríguez-Franco, Tesouro, & Sainz, 2015).

La doxiciclina, a diferencia de otras tetraciclinas, no provoca decoloración del esmalte de los dientes en cachorros. Además uno de los efectos adversos que es el vómito, puede corregirse dividiendo la dosis en tomas cada 12 horas o administrándolo junto con el alimento.

Históricamente se han usado otros fármacos para el tratamiento de ehrlichiosis. El cloranfenicol se ha usado en animales menores de un año, pero solo cuando la doxiciclina no se encuentra disponible. El propionato de imidocarb también ha sido propuesto como una alternativa, pero en un estudio in vitro y en perros infectados experimentalmente no se ha visto efecto contra *E. canis*, por lo que solo se recomienda cuando existe co-infección con *Babesia canis*.

El uso de esteroides se reserva solo cuando no hay respuesta significativa o hay complicaciones inmunes, como anemia hemolítica, trombocitopenia, uveítis, glomerulonefritis o vasculitis. En estos casos se recomienda utilizar prednisona o prednisolona a una dosis de 0.5-2 mg/kg/día y la duración dependerá de la seriedad y el tipo de complicación que se presente (Sainz et al., 2015).

2.3 Rickettsia rickettsii

La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (RMSF) es una enfermedad zoonótica transmitida por garrapatas, y fue de las primeras en ser reconocida en América. El agente etiológico que provoca esta enfermedad es la bacteria intracelular Gram negativa *Rickettsia rickettsii*,

descubierta en 1908 por el patólogo Howard Ricketts (Chen & Sexton, 2008). Los miembros del género *Rickettsia* también puede ser transmitido por otros artrópodos además de las garrapatas como lo son ácaros, pulgas y piojos (Costa et al., 2015).

En México el primer caso de Fiebre Manchada fue reportado en 1948 causada por *R. rickettsii* y como vector se identificaron garrapatas *Amblyomma cajennense* y *R. sanguineus*. 50 años después se dio otro brote de Fiebre Manchada en 3 zonas geográficas diferentes (Peniche-Lara, 2015).

R. rickettsii es una alfa proteobacteria del género *Rickettsia* y de la familia *Rickettsiaceae*. La familia *Rickettsiaceae* tiene dos géneros *Rickettsia* y *Orientia*. El género *Rickettsia* se subdivide en el grupo Tifus y en el grupo de Fiebre Manchada. *R. rickettsii* es el prototipo para el grupo de Fiebre Manchada que consiste en 20 especies (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación taxonómica <i>Rickettsia rickettsii</i>	
REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Alfa proteobacteria
ORDEN	Rickettsiales
FAMILIA	Rickettsiaceae
GENERO	<i>Rickettsia</i>
ESPECIE	<i>R. rickettsii</i>

Es una bacteria intracelular obligada y se divide por fisión binaria. Puede sobrevivir en el citosol y en el núcleo sin una vacuola que la proteja. Se puede propagar de célula a célula transversalmente sin causar gran daño a través de reclutamiento de filamentos de actina de las células del hospedador, lo cual permite también que entre al núcleo de las células. Este tipo de

propagación podría explicar por qué rara vez *R. rickettsii* se acumula en grandes cantidades en una sola célula.

Cuando *R. rickettsii* entra a un hospedador humano se localiza y multiplica en células endoteliales de vasos pequeños y medianos provocando vasculitis. La vasculitis es el mecanismo detrás de prácticamente toda la sintomatología clínica y anormalidades hematológicas presentes en la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. El mayor efecto patofisiológico provocado por esta bacteria es el aumento en la permeabilidad vascular causado por el daño en la adhesión entre células infectadas (Chen & Sexton, 2008).

La garrapata *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* son los vectores más comunes para *R. rickettsii* (Bratton & Corey, 2005). En América Central *Amblyoma cajennense* se ha identificado como vector tanto para perros como en humanos. Recientemente se ha comprobado que *R. Sanguineus* ha fungido como vector en Arizona, California, Texas, Brasil y en brotes en la parte norte de México (Nicholson et al., 2010).

Dado que los perros de compañía pueden llegar a ser fácilmente infestados por garrapatas, dependiendo del estilo de vida que lleven y el acceso que tengan a diferentes ambientes, son capaces de intercambiar ectoparásitos con animales de diferente especie y así introducir patógenos a otros lugares, dando lugar a que se puedan producir zoonosis (Costa et al., 2015).

En América Latina la transmisión de enfermedades rickettsiales generalmente se da por medio de roedores u otros animales silvestres, el contacto con perros podría aumentar el riesgo de contagio. Hay evidencia que sugiere que los perros están implicados en el ciclo de *R. rickettsii* como hospedadores amplificadores de la bacteria. Hay casos reportados de infección paralela de perros con sus dueños. Otro factor es que *R. sanguineus* también actúa como vector para *R. rickettsii* y ésta si es común encontrarla en zonas urbanas (Moreira-Soto et al., 2016).

Las infecciones con *R. rickettsii* induce una enfermedad extremadamente severa y potencialmente mortal en personas y perros. La enfermedad puede presentarse con un curso rápido y tener una alta tasa de mortalidad. Generalmente en 50-70% de los casos los pacientes reconocen haber sido mordido por una garrapata. Los síntomas comienzan generalmente de 5 a 7 días después de la inoculación (Bratton & Corey, 2005). Las personas con esta enfermedad al inicio presentan fiebres espontáneas, dolor de cabeza severo y malestar general. A las dos semanas de la infección los primeros síntomas persisten y además aparecen erupciones maculopapulares en la mayoría de los pacientes. Las lesiones generalmente aparecen en las palmas de las manos, tobillos, muñecas y antebrazos. Al aplicar presión a las lesiones, lo rosado desaparece. La erupción avanza a las axilas, glúteos, tronco, cuello y cara. Las lesiones se pueden juntar para formar grandes zonas equimóticas y ulceradas (Figura 6). Otros síntomas incluyen tos seca, dolor de garganta, dolor de pecho y dolor abdominal. Puede presentarse falla respiratoria y circulatoria; así como desórdenes neurológicos.

Los perros presentan fiebre, letargo, vómito y anorexia; conforme avanza la infección pueden aparecer signos oculares, desordenes hemorrágicos, dolor articular y signos neurológicos. La mortalidad puede ocurrir tanto en personas como en perros, por lo tanto el tratamiento nunca debe ser retrasado o ignorado (Nicholson et al., 2010).



Figura 6. Lesiones en espalda en un paciente con Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. (Nicholson et al., 2010)

2.4 *Borrelia burgdorferi*

La borreliosis de Lyme o enfermedad de Lyme, la cual es transmitida por garrapatas del complejo *Ixodes ricinus*, fue descrita como un nuevo microorganismo a finales de la década de 1970, en Old Lyme, Connecticut en Estados Unidos (Kurtenbach et al., 2006). Muchas de sus manifestaciones ya habían sido documentadas décadas antes en Europa. El agente etiológico *Borrelia burgdorferi*, fue aislado en 1982 de una garrapata *Ixodes dammini* (ahora *I. scapularis*) y después de un biopsia de piel, fluido cerebroespinal y sangre de pacientes con enfermedad de Lyme en los Estados Unidos y Europa. En Estados Unidos, el Centro para Control de Enfermedades (CDC) inició vigilancia de la enfermedad en 1982 y en 1990 se convirtió en enfermedad de notificación obligatoria (Aguero-Rosenfeld, Wang, Schwartz, & Wormser, 2005).

La enfermedad de Lyme es una enfermedad transmitida por garrapatas causadas por alguna de las espiroquetas del complejo *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Con 85,000 casos anuales en Europa y 300.000 casos estimados anuales en Estados Unidos, es la enfermedad transmitida por garrapatas más común del hemisferio norte. Casi todas las infecciones en humanos son provocadas por una de estas 3 genoespecies de *Borrelia burgdorferi sensu lato*: *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* y *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Las tres provocan la enfermedad de Lyme en Europa y *Borrelia burgdorferi sensu stricto* en Estado Unidos (Pritt et al., 2016).

Tabla 5. Clasificación taxonómica <i>Borrelia burgdorferi</i>	
REINO	Bacteria
FILO	Spirochaetes
CLASE	Spirochaetes
ORDEN	Spirochaetales
FAMILIA	Spirochaetaceae
GENERO	<i>Borrelia</i>
ESPECIE	<i>B. burgdorferi</i>

El género *Borrelia* es un grupo de bacterias helicoidales móviles, que conforman el filo Spirochetes, que tiene dos clases. Se ha asociado grupos específicos de bacterias con ciertas especies de garrapatas que actúan como vectores de ellas, pero aún se considera controversial (Tabla 5) (Nunes et al., 2016).

B. burgdorferi es una bacteria helicoidal con múltiples endoflagelos, que le dan la capacidad de moverse. Tienen de 3 a 10 vueltas, miden de 10-30 μm de longitud y de 0.2-0.5 μm de ancho. Los organismos pueden visualizarse en microscopio con campo oscuro. Es la primer espiroqueta en ser secuenciada en su totalidad, el tamaño de su genoma es de 1, 521, 419 pares de bases y tiene cromosoma linear y 21 plásmidos (Aguero-Rosenfeld et al., 2005).

Los principales vectores de la enfermedad son las garrapatas del género *Ixodes*: *I. scapularis*, *I. pacificus* en Norteamérica; *I. ricinus* en Europa e *I. persulcatus* en Asia. Dado que los reservorios de esta bacteria son muy abundantes, es muy probable que la dispersión de *B. burgdorferi* este correlacionada con la diseminación de su vector, lo que resultaría en un aumento en la incidencia de la enfermedad en determinadas regiones. Además de estas especies de garrapatas *Borrelia spp.* puede ser transmitida por otros vectores como *I. hexagonus* e *I. canisuga* que generalmente están ligados a erizos y zorros, respectivamente; estas garrapatas no suelen infestar humanos pero pueden contribuir en el mantenimiento del ciclo de transmisión natural. En Egipto el agente de la enfermedad de Lyme, fue encontrado en garrapatas blandas y en *Rhipicephalus spp.*, *Hyalomma spp.* y *Ornithodoros savignyi*. Esta espiroqueta ha sido detectada en otros vectores que no son garrapatas como en mosquitos (*Aedes spp.* y *Culex spp.*) y pulgas (*Ctenophtalmus* y *Ctenocephalides*) (Franke, Hildebrandt, & Dorn, 2013).

Las espiroquetas pueden causar enfermedad en el humano, mientras que sus reservorios pueden estar persistentemente infectados sin presentar síntomas de la enfermedad. Las garrapatas *Ixodes* se alimentan una vez en cada etapa de su vida. La adquisición de *B. burgdorferi* ocurre cuando la larva se alimenta de un hospedador infectado. Las espiroquetas invaden los intestinos, sobreviven la muda a ninfa, que posteriormente la transmitirá al hospedador del cual se alimente. La infección persistente en estos hospedadores y la posterior adquisición de la espiroqueta por las larvas es lo que completa el ciclo (Figura 7) (Bhatia et al., 2018).

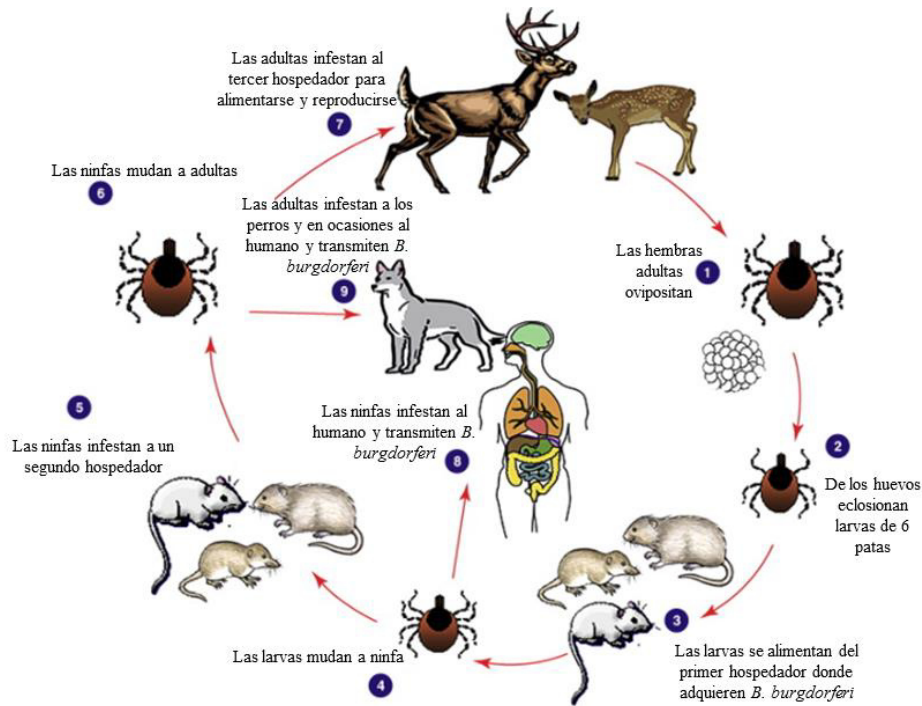


Figura 7. Ciclo de *Borrelia Burgdorferi*. (CDC, 2017)

El principal síntoma de la enfermedad de Lyme es eritema migrans, una lesión en la piel de lenta expansión, que indica una infección temprana y localizada. Si la infección se distribuye a otros tejidos y órganos puede causar borreliosis diseminada como neuroborreliosis, artritis de Lyme, linfocitoma, acrodermatitis crónica, cardiopatía de Lyme y manifestaciones oculares (Hofhuis, Harms, Bennema, Van Den Wijngaard, & Van Pelt, 2015).

Eritema migrans, comienza en el lugar donde estuvo la garrapata con el aspecto macular que se va expandiendo rápidamente, mientras esto sucede el centro se empieza a poner más claro (Figura 8). En esta etapa los pacientes pueden estar asintomáticos o presentar síntomas parecidos a una gripa como dolor de cabeza, mialgia, fiebre y artralgias. Con la diseminación de la bacteria a sistema nervioso, corazón, articulaciones los pacientes pueden presentar múltiples lesiones de eritema migrans, defectos en la conducción atrioventricular, miopericarditis, artritis, parálisis facial, meningitis y meningoradiculoneuritis o síndrome de Bannwarth's. En pacientes que no son

diagnosticados en las etapas tempranas de la enfermedad, desarrollan artritis, neuroborreliosis y acrodermatitis atrófica crónica. La artritis en las articulaciones grandes puede persistir por meses a pesar de recibir tratamiento con antimicrobianos, se sospecha de que la autoinmunidad juega un papel importante en la presentación de estos síntomas (Aguero-Rosenfeld et al., 2005).



Figura 8. Eritema migrans en pacientes con enfermedad de Lyme.
(Stanek, 2003)

En perros los síntomas por infección temprana de enfermedad de Lyme incluyen fiebre, inflamación, dolor, cojera, linfadenopatía y malestar generalizado. En la etapa más crónica se ha reportado falla renal aguda, arritmia cardíaca, edema periférico, desórdenes neurológicos y artritis severa. En el estado de Texas en Estados Unidos, ha habido reportes de enfermedad de Lyme en perros domésticos así como en coyotes del condado de Webb (Vasquez-espinoza, Beck, & Beck, 2015).

Dependiendo la etapa de la enfermedad y los signos se han utilizado diferentes antibióticos como doxiciclina, amoxicilina, ceftriaxona y azitromicina o una combinación de ellos. Aún existen muchas interrogantes en cuanto al tratamiento, hay estudios en los que se comprueba que pacientes con parálisis facial a los que se les administro antibióticos y prednisona, tuvieron resultados peores que aquellos que solo recibieron antibioticoterapia (Stanek, Wormser, Gray, & Strle, 2003).

2.5 Co-infecciones

La co-infección de garrapatas y co-transmisión de patógenos tiene importancia por sus implicaciones en la presentación de los síntomas clínicos que producen y su impacto en la salud pública. La presencia de co-infección tanto en humanos como en animales aumenta la severidad de los cuadros clínicos como es común en los casos de Lyme que cursan con co-infección de babesiosis. Además de patógenos, las garrapatas pueden ser portadores de simbiontes, los cuales a veces tienen un rol importante en la biología de las garrapatas. Los simbiontes también pueden llegar a interferir en la transmisión de estos patógenos, por ejemplo los endosimbiontes del género *rickettsial* se presume que interfiere en la transmisión de otros patógenos rickettsiales. En 2016 se realizó un estudio con garrapatas *Ixodes spp.* para determinar el grado de co-infección que podían presentar, utilizando 37 especies de bacterias y parásitos transmitidos por garrapatas; teniendo como resultado que el 9 % de las muestras resultaron portadoras de ADN de 2 patógenos, el 6.7% de 3 patógenos, el 1.9% de 4 patógenos, y 0.75% de 5 patógenos (Moutailler, Moro, Vaumourin, & Michelet, 2016).

La infección con patógenos del género *Ehrlichia* y *Rickettsia* ha sido documentado tanto en humanos como en perros, los cuales presentan una gran variedad de signos clínicos. En recientes investigaciones se ha encontrado la presencia de co-infecciones con estos patógenos. Sin embargo las consecuencias de estas, no han podido ser establecidas. La infección simultánea con estos patógenos puede ocurrir como resultado de la mordedura de una misma garrapata portadora de varios de ellos o por adquisición en eventos diferentes por diferentes garrapatas. Los perros presentan mayor riesgo de contraer más de un patógeno debido a que suelen infestarse con una gran cantidad de garrapatas al mismo tiempo, a diferencia de los humanos (Kordick et al., 1999).

Una de las características de las co-infecciones son la presentación de sintomatología clínica más severa, sobre todo anemia. La importancia de detectar las co-infecciones radica en poder dar el tratamiento adecuado. Los perros jóvenes tienden a padecer co-infecciones más que los perros adultos, se presume que los perros adultos desarrollan alguna resistencia a estas enfermedades de haber estado expuestos a ellas siendo más jóvenes (Rojas et al., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido que a partir del año 2009 se incrementó el registro de casos por asociación clínico-epidemiológica de rickettsiosis en el Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades Sujetas a Vigilancia Epidemiológica, registrándose en Nuevo León 129 casos. La oportuna detección y tratamiento de estas enfermedades es crucial en el pronóstico de recuperación del paciente. La relación cada vez más estrecha entre las personas y sus mascotas representan un factor de riesgo en la propagación de estas enfermedades. Al ser estas un problema de salud pública requiere de estrategias para su control y prevención, mediante el uso de herramientas de vigilancia epidemiológica e identificación de factores de riesgo.

4. HIPÓTESIS

Las garrapatas de la zona metropolitana de Monterrey son portadoras de *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii* debido a que las condiciones climatológicas de la zona permite que el ciclo de estos vectores, así como las bacterias pueda desarrollarse de manera óptima.

5. OBJETIVO

Detectar la presencia de *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii* y *Borrelia burgdorferi* en garrapatas de Monterrey y su zona metropolitana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las especies de garrapatas presentes en la zona metropolitana de Monterrey.
- Determinar si estas garrapatas son portadoras de los patógenos de interés.
- Determinar si la co-infección de estas bacterias es posible en las garrapatas de la zona metropolitana de Monterrey.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El muestreo fue realizado en la zona metropolitana de Nuevo León incluyendo los municipios de Monterrey, Apodaca, Guadalupe, San Nicolás de los Garza, Escobedo, San Pedro Garza García, Santa Catarina y García (Figura 8).

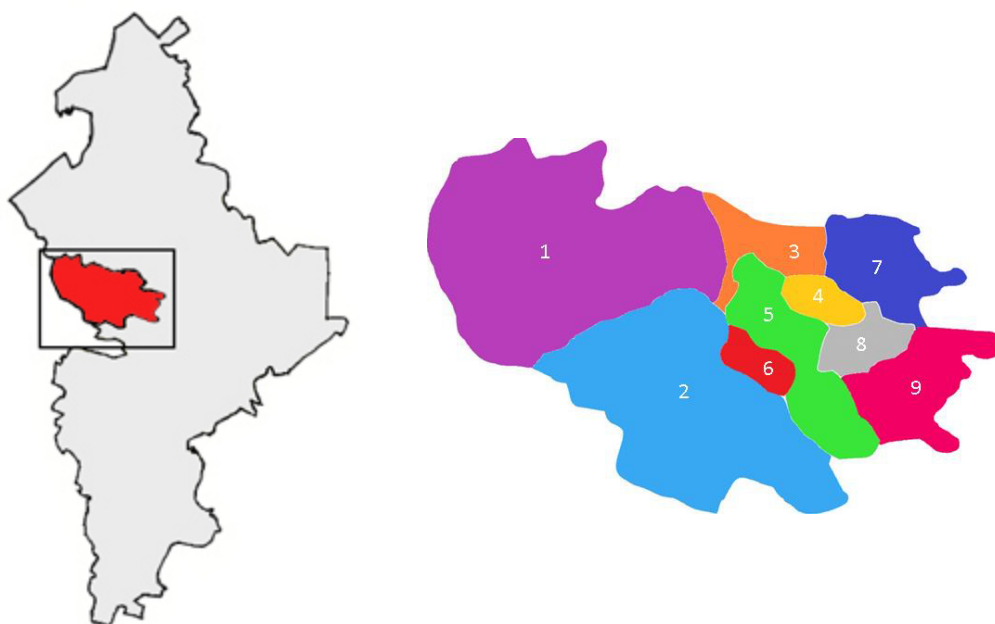


Figura 9. Municipios muestreados de la zona metropolitana de Monterrey. García (1), Santa Catarina (2), Escobedo (3), San Nicolás de los Garza (4), Monterrey (5), San Pedro Garza García (6), Apodaca (7), Guadalupe (8)

En Monterrey, se encuentra el cerro de la Silla a 1 800 metros sobre el nivel del mar (msnm) y en dirección al sur se encuentran sierras formadas por rocas donde está el cerro El Morro, el cual está a 3703 msnm.

Hacia el norte existen lomeríos, que son interrumpidos por sierras formando valles, y se les llaman potreros como San José de la Popa.

Existe también una llanura llamada población Anáhuac, que se encuentra en los límites con Tamaulipas.

El clima del estado es un 68% seco y semiseco, en la región de la llanura costera del Golfo del Norte el 20% del clima se considera cálido subhúmedo, en las partes altas de las sierras se presenta clima templado abarcando el 7% y el resto pertenece a la Sierra Madre Occidental con un clima muy seco.

La temperatura media al año es de 20°C, con un promedio máximo de 32°C las cuales se presentan de mayo a agosto, y el promedio mínimo de 5°C en el mes de enero. Las lluvias se presentan en verano, con un promedio de precipitación de 650mm anuales.

La zona metropolitana cuenta con 5, 119, 504 habitantes de los cuales el 95% se concentra en la zona urbana, convirtiéndola en la tercera más poblada del país. (INEGI, 2015)

6.2 Muestreo

Se realizó un muestreo simple aleatorio de perros infestados con garrapatas dentro de la zona metropolitana de Monterrey.

El número de muestras necesarias para el experimento se determinó utilizando el programa Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for Veterinary Medicine (Thrusfield et al., 2001, Ortega *et al.*, 2000).

Para la obtención de muestras se solicitó a clínicas veterinarias la toma de garrapatas a pacientes sin importar el motivo de la visita. Así mismo se acudió a Centros de Control Animal. A los

dueños de los pacientes que se les tomo muestra en clínicas particulares, se les pidió llenar una encuesta para evaluar factores de riesgo. A los ejemplares muestreados de los Centros de Control Animal solo se recolectaron datos de sus características físicas.

Las garrapatas se recolectaron en tubos con alcohol al 70%, procurando recolectar un mínimo de 5 garrapatas por perro muestreado. Cada tubo fue previamente identificado, así como la encuesta correspondiente. Se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta su posterior traslado al laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su procesamiento.

6.3 Encuesta

Los datos solicitados a los propietarios de las mascotas muestreadas fueron los siguientes: edad de la mascota (<1 año, 2-6 años, >7 años), sexo de la mascota (macho o hembra), talla de la mascota (chico, mediano, grande), tipo de pelaje (corto, mediano, largo), tipo de piso donde se encuentra la mascota (pasto o tierra, piso), grado de infestación (ligera 1-5 garrapatas, moderada 5-50 garrapatas, severa >50 garrapatas) y si se manejó algún programa preventivo (desparasitaciones internas, baños garrapaticidas, fumigación a la casa, uso de tratamientos preventivos como collares, pipetas, tabletas) (Tinoco-Gracia et al, 2011)

6.4 Identificación de las garrapatas

La identificación de las garrapatas se realizó mediante observación bajo el estereoscopio (Iroscope, modelo NZ-14) y comparándolas con guías de identificación de ectoparásitos utilizando claves dicotómicas, según sus características morfológicas.

6.5 Extracción de ADN

La maceración de las garrapatas se llevó a cabo utilizando la técnica de FastPrep®-24 (MP Biomedicals) modificado. En un tubo de lisis de 2 ml con vidrio molido de diferente tamaño, se colocó un espécimen, en el caso de garrapatas hembras adultas y 3 especímenes en caso de machos o ninfas. Se agregó 500 µl de Buffer de Lisis y se realizaron 6 ciclos de 1 minuto de agitación y 5 minutos de descanso en el FastPrep®-24 (MP Biomedicals).

La extracción de ADN de las muestras se realizó mediante el método de Fenol-Cloroformo-alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1). El material resultante de la maceración fue centrifugado a 13,000 rpm por 2 minutos. Se tomó la mayor cantidad del sobrenadante y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se incubó en termoblock (AccuBlock Labnet International Inc.) a 65°C por período de 1 hora, dando agitación cada 15 minutos para homogenizar el contenido. Fueron agregaron 500 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1) y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. 350 µl del sobrenadante fueron colocados en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml se agregaron 65 µl de Acetato de Sodio (NaOAC) y 75 µl de Cloruro de Sodio (NaCl), se agitó para homogenizar y se congeló por 30 minutos. Posterior a este tiempo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se tomaron 500 µl de sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se le añadió 270 µl de Isopropanol y se congeló a -20°C por 10 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió con etanol al 70%, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se puso a secar en incubadora a 37°C. Posteriormente se resuspendió con 20 µl de agua DEPC y se almacenaron a -20°C.

6.5.1 Cuantificación de ADN

Dada la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de absorber la luz ultravioleta, se decidió realizar cuantificación por espectrofotometría para determinar la cantidad y calidad del ADN resultante de las extracciones. Para realizarlo se utilizó el equipo Quantus Fluorometer™

(PROMEGA) y el kit QuantiFluor™ ds DNA (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.5.2 Análisis de productos de extracción de ADN

Para cerciorarse de la presencia de ADN en las extracciones se prepararon geles de agarosa al 0.8%. Se colocaron 2 µl de la muestra, con 2 µl de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain y 2 µl de azul de bromofenol. En la cámara de electroforesis se colocó el gel de agarosa al 0.8% con buffer SB al 1%, y se corrió por 20 minutos a 120 Volts. Posteriormente se observó en el transiluminador MultiDoc-Lt. Digital Imaging System (Upland CA, USA).

6.6 PCR

Los protocolos de PCR se realizaron utilizando los siguientes primers y protocolos para éstos:

Protocolo PCR para *Ehrlichia canis*

Primer F (HE-3-R)

5' - TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT -3'

Primer R (Ec HE1)

5' - CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG AA-3'

Desnaturalización inicial	94°C por 5 minutos	
Desnaturalización	94°C por 1 minuto	40 ciclos
Alineamiento	60°C por 1 minuto	
Extensión	72°C por 1 minuto	

Extensión final	72°C por 1 minuto
Amplificación	480 pb

Protocolo PCR para *Rickettsia rickettsii*

Primer F (CS78)

5' - GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT -3'

Primer R (CS323)

5' - GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T -3'

Desnaturalización inicial	94°C por 5 minutos	
Desnaturalización	94°C por 30 segundos	35 ciclos
Alineamiento	57°C por 2 minutos	
Extensión	70°C por 2 minutos	
Extensión final	70°C por 10 minutos	
Amplificación	265 pb	

Protocolo PCR para *Borrelia burgdorferi*

Primer F

5' - AAC ACA CCA GCA TCA CTT TCA GG -3'

Primer R

5'- GAG AAT TAA CTCCGC CTT GAG AAG G -3'		
Desnaturalización inicial	94°C por 1 minuto	
Desnaturalización	93°C por 30 segundos	40 ciclos
Alineamiento	57°C por 30 segundos	
Extensión	72°C por 30 segundos	
Extensión final	72°C por 1 minuto	
Amplificación	245 pb	

6.6.1 Análisis de productos de PCR

Para el análisis de los resultados de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa al 1.5%. Se colocaron 5 µl de producto de PCR, con 5 µl de GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain y 5 µl de azul de bromofenol. En la cámara de electroforesis se colocó el gel de agarosa al 1.5% con buffer SB al 1%, y se corrió por 1 hora a 120 Volts. Se colocó una escalera de peso molecular, un control positivo, posteriormente las muestras y por último un control negativo. Posteriormente se observó en el transiluminador MultiDoc-Lt. Digital Imaging System (Upland CA, USA), considerándose muestras positivas las que amplificaron al mismo nivel que el control positivo.

7. RESULTADOS

7.1 Área de Estudio

Se logró obtener muestras de los 8 municipios planteados desde el inicio del trabajo, obteniendo las siguientes muestras por municipio:

Tabla 6. Muestras obtenidas por municipio	
MUNICIPIO	MUESTRAS
Apodaca	84
Escobedo	72
San Nicolás de los Garza	81
San Pedro Garza García	2
Monterrey	69
García	40
Guadalupe	37
Santa Catarina	36
TOTAL	421

7.2 Muestreo

El número de muestras necesarias para el experimento que arrojo el programa Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for Veterinary Medicine (Thrusfield et al., 2001, Ortega *et al.*, 2000) fue de 384 muestras. El número total de muestras recolectadas y procesadas fue de 421.

7.3 Encuestas

Los datos de frecuencias que arrojaron las 421 encuestas fueron los siguientes:

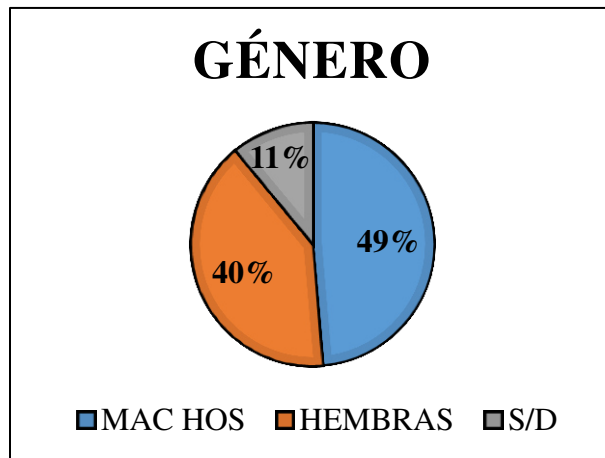


Figura 10. Género de los perros muestreados.

Machos 49% (196), hembras 40% (158), sin datos 11% (67)

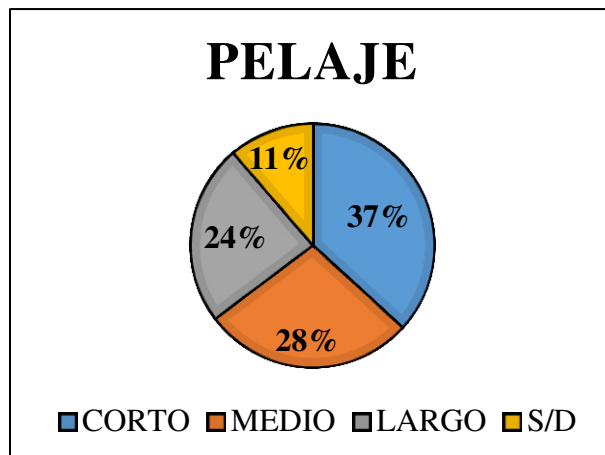


Figura 11. Tipo de pelaje de los perros muestreados.

Corto 37% (152), medio 28% (114), largo 24% (88), sin datos 11% (67)

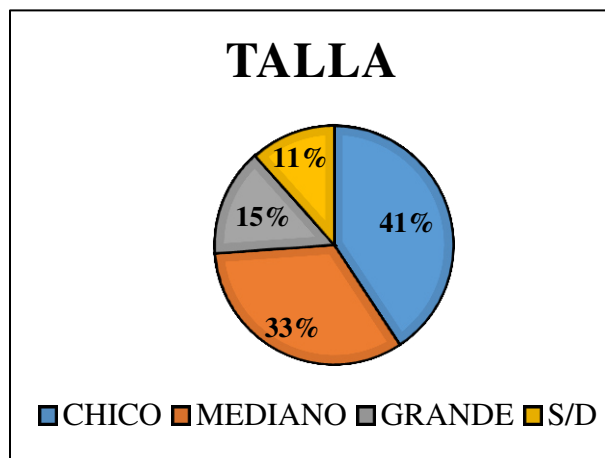


Figura 12. Talla de los perros muestreados.

Chicos 41% (167), medianos 33% (128), grande 15% (58), sin datos 11% (68)

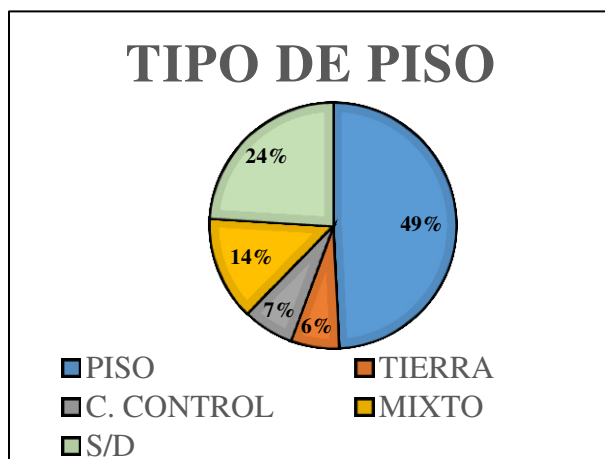


Figura 13. Tipo de piso donde viven los perros muestreados.

Piso 49% (202), tierra 6% (24), mixto 14% (54), centro de control canino 7% (20),
sin datos 24% (114).

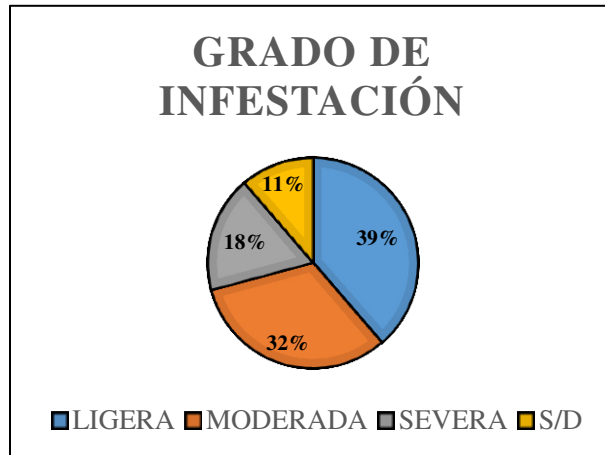


Figura 14. Grado de infestación de los perros muestreados.

Ligera 39% (143), moderada 32% (138), severa 18% (73), sin datos 11% (67)

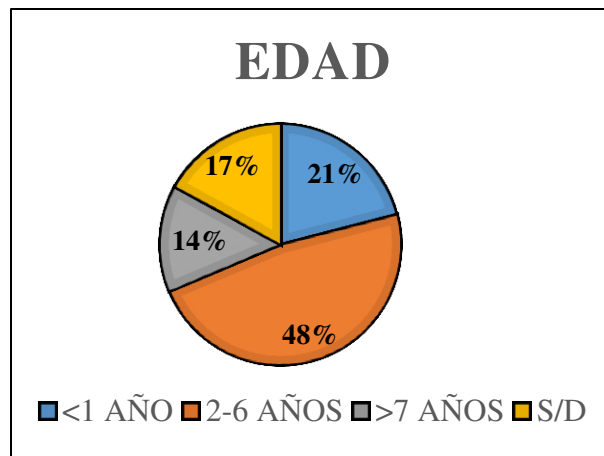


Figura 15. Edad de los perros muestreados.

<1 año 21% (96), 2-6 años 48% (185), >7 años (53), sin datos 17% (87)

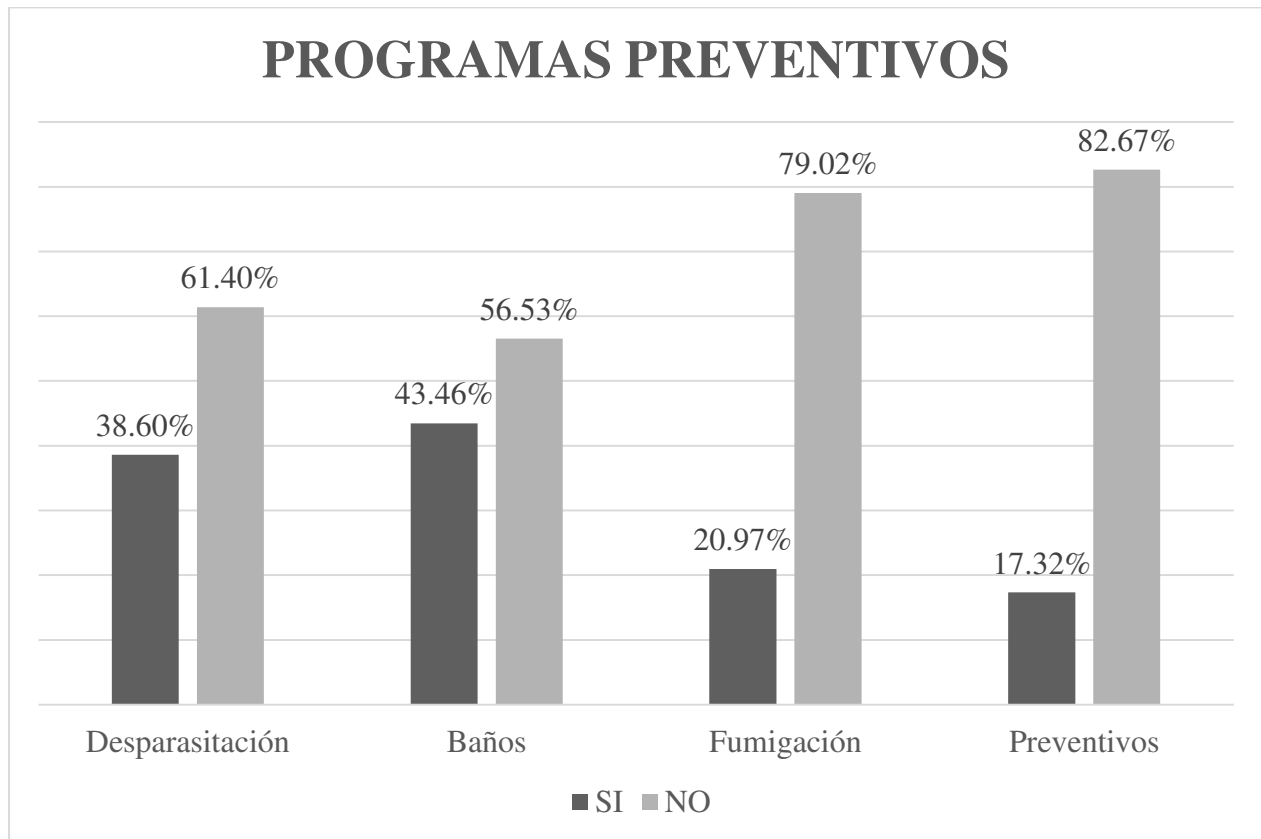


Figura 16. Programas Preventivos utilizados por los dueños de los perros muestreados.

7.4 Identificación de las garrapatas

En el muestreo que se realizó se encontraron 2 especies diferentes de garrapatas.

Tabla 7. Garrapatas encontradas en la Zona Metropolitana de Monterrey

<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	416
<i>Dermacentor variabilis</i>	5
Total	421

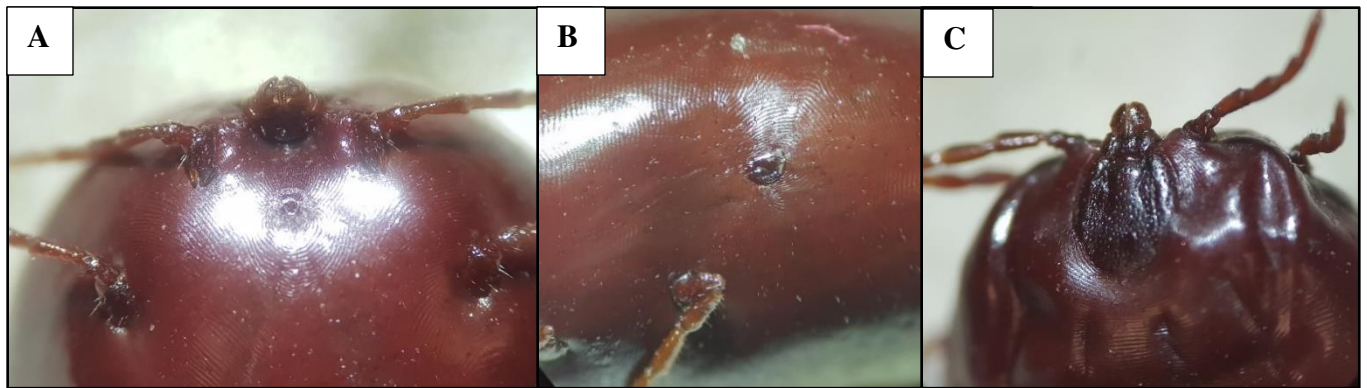


Figura 17. *Rhipicephalus sanguineus*. Hembra. A. Poro genital. B. Espiráculo. C. Gnagostoma forma hexagonal y palpos e hipostoma del mismo tamaño

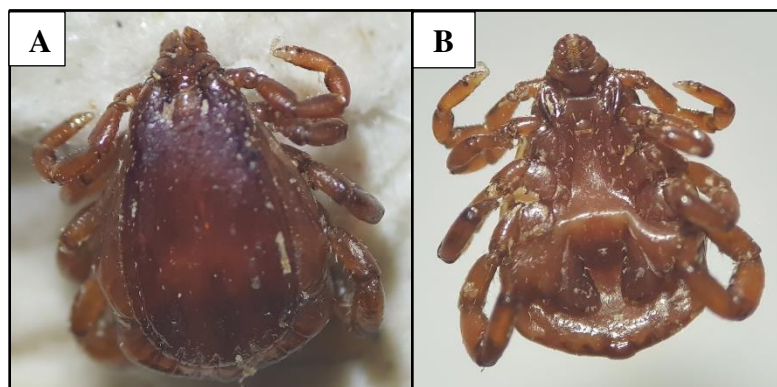


Figura 18. *Rhipicephalus sanguineus*. Macho. A. Gnagostoma hexagonal. B. Coxas del mismo tamaño. Poro anal entre placas adenales.



Figura 19. *Dermacentor variabilis*. Hembra. A. Espinas en base de las coxas. B. Espiráculo en forma de “coma”. C. Gnagostoma rectangular.

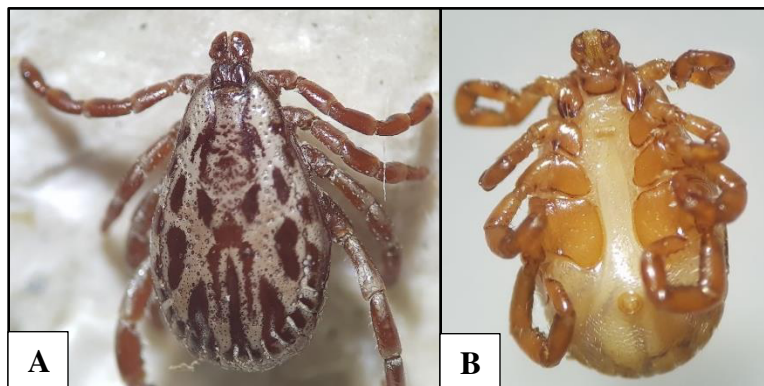


Figura 20. *Dermacentor variabilis*. Macho. A. Gnagostoma en forma rectangular y de menor tamaño que lo palpos. B. Coxas en tamaño ascendente.

7.5 Extracción ADN de las garrapatas

Después de realizar las extracciones de ADN con el protocolo de fenol-cloroformo-alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1) de las muestras recolectadas se procedió a correr los geles de agarosa al 0.8% para comprobar la presencia de ADN. En las muestras que no se apreció presencia de ADN

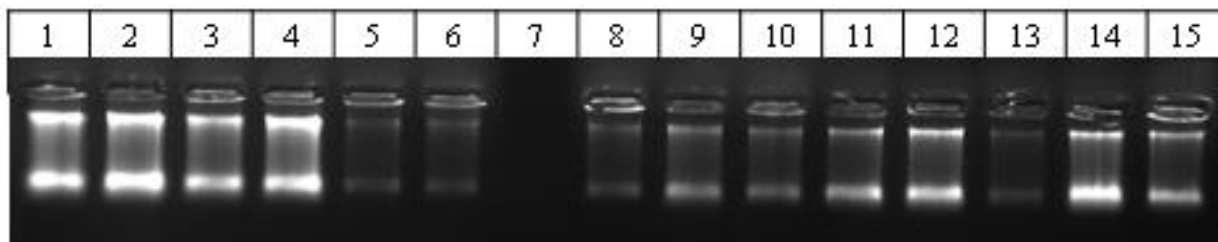


Figura 21. ADN de las extracciones de garrapatas con la técnica fenol-cloroformo ni en el gel ni en la cuantificación, se repitió la extracción de dicha muestra.

7.5.1 Cuantificación de ADN

Con el material resultante de las extracciones de ADN también se procedió a realizar cuantificación de ADN para asegurarnos que había cantidad suficiente para su procesamiento en PCR posteriormente.

Se obtuvieron lecturas entre 26 a 62 ng/μl, los cuales son suficientes ya que para realizar PCR se necesitan entre 20 a 50 ng/μl.

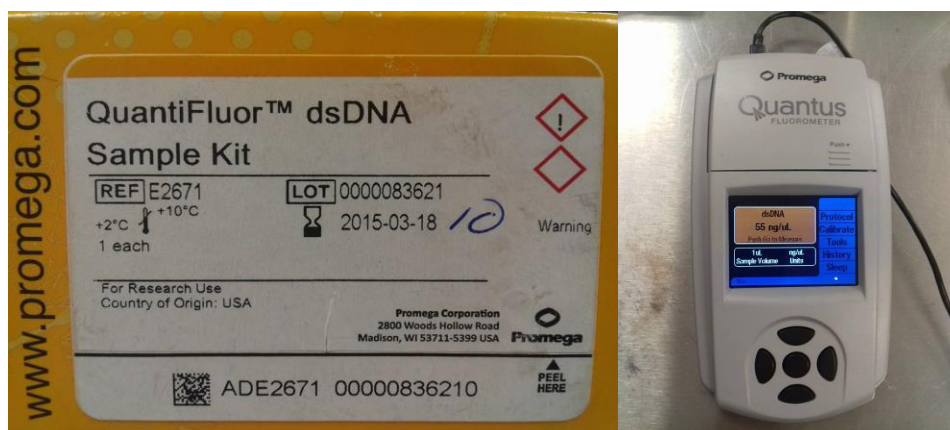


Figura 22. Cuantificador y kit utilizados para cuantificar ADN

7.5.2 Análisis de productos de PCR

Se hicieron pools a partir de 5 muestras, tomando 5 µl de cada uno, para un volumen final de 25µl en cada tubo, formando un total de 85 pools. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 8. Pools	
<i>Ehrlichia canis</i>	75.30% (64)
<i>Rickettsia rickettsii</i>	34.12 % (29)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0% (0)

A partir de los resultados positivos de los pools, se procedió a correr las muestras individuales que se encontraban dentro de cada pool. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 9. Muestras Individuales	
<i>Ehrlichia canis</i>	52.73 % (222)
<i>Rickettsia rickettsii</i>	8.07% (34)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0 % (0)

Una vez obtenidos todos los resultados de las muestras individuales se determinó en que muestras había presencia de co-infección entre *E. canis* y *R. rickettsii* obteniendo un 4.75% (20).

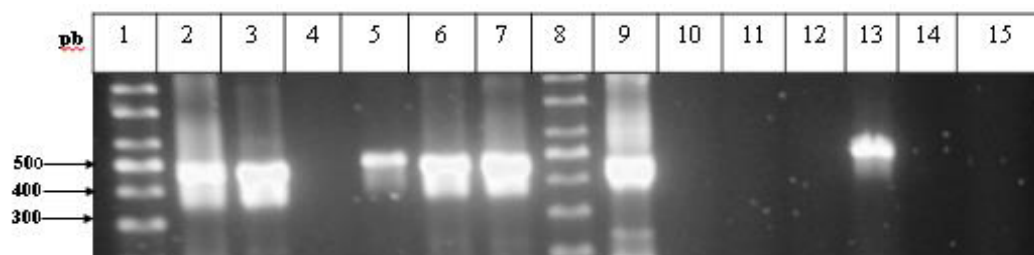


Figura 23. Amplificación de ADN de *E. canis*. Carril 1 y 8: Marcador de Peso Molecular 100 pb . Carril 2: Control positivo a 480 pb. Carril 3 y 9: Pools positivos. Carril 4-7 y 10-14: muestras individuales. Carril 15: Control Negativo.



Figura 24. Amplificación de ADN de *R. rickettsii*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100 pb. Carril 2: Control positivo a 265 pb. Carril 3-13: muestras individuales. Carril 14: Control Negativo.



Figura 25. Amplificación de ADN de *B. burgdorferi*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100 pb . Carril 2: Control Positivo a 245pb. Carril 3-18 pools. Carril 19: Control Negativo.

DISCUSIÓN

En 2015 en un estudio realizado por Vásquez-Espinoza y Beck utilizando PCR en Nuevo Laredo, Tamaulipas se reportó la presencia de *Borrelia burgdorferi* (9.8%) y *Ehrlichia canis* (12.5%) en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, mientras que en nuestro muestreo no se obtuvieron muestras positivas a *B. burgdorferi* y para *E. canis* fue mucho más elevado con un 52.73%. En cuanto a borreliosis se presume que en Monterrey no se detectó debido a que los perros tienen menor contacto con los reservorios de *B. burgdorferi*. En este mismo estudio encontraron co-infección entre *B. burgdorferi* y *E. canis* en el 1.8% de las muestras y no detectaron presencia de *R. rickettsii*, contrastando con nuestros resultados donde no se detectó la presencia de *B. burgdorferi* en ninguna muestra y un 8.07% de muestras dieron positivas a *R. rickettsii*, y un 4.75% de co-infección entre *E. canis* y *R. rickettsii*.

En la zona de la Comarca Lagunera se recolectaron 519 garrapatas de las cuales ninguna resultó positiva a *E. canis*, a diferencia de nuestro estudio en el que las muestras positivas fueron un poco más del 50%, se le atribuye la baja prevalencia a que las garrapatas provenían de perros clínicamente sanos, pero en nuestro muestreo también los perros a los que se les tomaron muestras, se presentaban clínicamente sanos, además los primers y el protocolo para extracción de ADN son diferentes, por lo que también la sensibilidad de los primers y el kit para extracción de ADN utilizados por Almanza et al. pudiesen tener menor sensibilidad que los utilizados para nuestros protocolos de PCR (Almanza, 2015).

A pesar de que *R. sanguineus* es el único vector reconocido como transmisor de *E. canis* (Groves, Dennis, Amyx, & Huxsoll, 1975), 3 de las 5 garrapatas del género *D. variabilis* que fueron muestreadas resultaron positivas a *E. canis*, aunque se desconoce si los perros muestreados también portaban la enfermedad, los resultados obtenidos por Johnson donde demostraron la capacidad de transmisión de *E. canis* a través de *D. variabilis* sugieren que esta garrapata si tiene la capacidad de transmitir la enfermedad (Johnson et al., 1998), por lo que es necesario mayor investigación en el rol que tiene *D. variabilis* en la transmisión de ehrlichiosis en perros en esta zona, ya que otros canidos silvestres pueden ser portadores de *E. canis* y tienen mayor

predisposición a ser infestados por esta especie de garrapata, por lo que *D. variabilis* podría tener un rol mucho más importante en la epidemiología de la ehrlichiosis. A pesar de que *R. sanguineus* por lo general no infesta humanos, los estadios de ninfa de *D. variabilis* si lo hace, por lo que encontrar ambas garrapatas y ambos patógenos en perros que viven en la zona metropolitana de Monterrey, representa un riesgo a la salud pública.

En 2013 Galaviz-Silva ya habían reportado la presencia de *D. variabilis* en perros en el estado de Nuevo León, en los municipios de Guadalupe, Pesquería, Juárez, Apodaca, Monterrey, Escobedo y San Nicolás de los Garza, en nuestro muestreo en estos 3 últimos municipios fue donde hubo presencia de esta especie de garrapata; así como en el municipio de García (Guzmán-Cornejo et al., 2016).

En 1999 Salinas-Meléndez detectaron mediante inmunofluoresceína anticuerpos contra *B. burgdorferi* en perros en Monterrey, con una prevalencia del 16%, así como evidencia molecular en muestras de líquido sinovial de perros con artritis; a pesar de que la PCR se considera más sensible, sin embargo, en este trabajo no se logro detectar la presencia de *B. burgdorferi* (Tinoco-Gracia, 2011).

Hay evidencia de co-infecciones, de diferentes patógenos tanto en humanos como en perros, un análisis encontró que co-infecciones entre *Anaplasma phagocytophilum* y *B. burgdorferi* en garrapatas tienen una prevalencia del 0.1% hasta 28.1%. En este estudio se encontró una co-infección con *E. canis* y *R. rickettsii* en el 4.75% de las garrapatas muestreadas. La presencia de co-infección varía de región a región dependiendo de la prevalencia de dichos patógenos y de los vectores que las transmiten. De ahí la importancia de monitorear la presencia de qué patógenos están presentes en la zona metropolitana y las garrapatas que pudiesen fungir como reservorios de estos.

CONCLUSIONES

La detección de 2 de los 3 patógenos en las garrapatas recolectadas en la zona metropolitana de Monterrey, indican un riesgo potencial de infección para los humanos y perros.

La detección de garrapatas *D. variabilis* en perros de la zona metropolitana de Monterrey, representa un nuevo factor de riesgo para la transmisión de enfermedades.

Tanto las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* como las *Dermacentor variabilis* resultaron positivas a *E. canis* y *R. rickettsii*, pero ninguna *D. variabilis* resultó positiva a *R. rickettsii* a pesar de ser el principal vector de esta bacteria. Por lo que el riesgo de contraer Fiebre Manchada sigue estando presente.

D. variabilis podría fungir como vector y/o reservorio de *E. canis*.

La presencia de co-infecciones en garrapatas con *E. canis* y *R. rickettsii* sin que exista competencia entre ellas, aumenta aún más el riesgo de transmisión de enfermedades, después de una sola exposición a picadura de garrapata.

Las garrapatas recolectadas no resultaron positivas a *B. burgdorferi* probablemente debido al grado de urbanización en la zona metropolitana, por lo que el riesgo de contraer la enfermedad de Lyme es bajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguero-Rosenfeld, M. ., Wang, G., Schwartz, I., & Wormser, G. . (2005). Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 484–509.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.484>
- Beugnet, F., & Marie, J. (2009). Veterinary Parasitology Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe, 163, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.028>
- Bhatia, B., Hillman, C., Carracoi, V., Cheff, B. N., Tilly, K., & Rosa, P. A. (2018). Infection history of the blood-meal host dictates pathogenic potential of the Lyme disease spirochete within the feeding tick vector. *PLOS Pathogens*, 14(4), e1006959.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006959>
- Bratton, R. L., & Corey, G. R. (2005). Tick-borne disease. *American Family Physician*, 71(12), 2323–2332. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1974.02110250135023>
- Brites-neto, J., Maria, K., Duarte, R., & Martins, T. F. (2015). Tick-borne infections in human and animal population worldwide, 8, 301–316. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.301-315>.
- Caetano, R. L., Vizzoni, V. F., Bitencourth, K., Carriço, C., Sato, T. P., Pinto, Z. T., ... Gazeta, G. S. (2017). Ultrastructural morphology and molecular analyses of tropical and temperate “species” of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 54(5), 1201–1212. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx066>
- Chen, L. F., & Sexton, D. J. (2008). What’s New in Rocky Mountain Spotted Fever? *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(3), 415–432. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.008>
- Cicuttin, G. L., Vidal, P., De Salvo, N., Beltrán, F. J., & Gury, F. E. (2014). Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 563–568. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500008>

- Costa, A. P. da, Costa, F. B., Labruna, M. B., Silveira, I., Moraes-Filho, J., Soares, J. F., ... Guerra, R. de M. S. N. de C. (2015). A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(1), 28–35.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612015008>
- Dantas-torres, F. (2015). International Journal for Parasitology : Parasites and Wildlife Climate change , biodiversity , ticks and tick-borne diseases : The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 452–461.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.07.001>
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2015). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 9–13.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>
- Dergousoff, S. J., & Chilton, N. B. (2007). Differentiation of three species of ixodid tick, *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* and *D. albipictus*, by PCR-based approaches using markers in ribosomal DNA. *Molecular and Cellular Probes*, 21(5–6), 343–348.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.04.003>
- Ferrolho, J., Simpson, J., Hawes, P., Zwegarth, E., & Bell-Sakyi, L. (2016). Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(4), 631–637.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.013>
- Fielden, L. J., Jones, R. M., Goldberg, M., & Rechav, Y. (1999). Feeding and respiratory gas exchange in the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Journal of Insect Physiology*, 45(4), 297–304. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00127-9)

- Földvári, G., Šíroký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: A vector on the rise. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–29.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1599-x>
- Franke, J., Hildebrandt, A., & Dorn, W. (2013). Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes - Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1–2), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.06.007>
- Fritz, C. L. (2009). Emerging Tick - b orne Dis eas es. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 39(2), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.10.019>
- Groves, M. G., Dennis, G. L., Amyx, H. L., & Huxsoll, D. L. (1975). Transmisión of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American journal of veterinary research* (Vol. 36).
- Guillemi, E. C., Tomassone, L., & Farber, M. D. (2015). Tick-borne Rickettsiales : Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.009>
- Guzmán-Cornejo, C., Robbins, R. G., Guglielmone, A. A., Montiel-Parra, G., Rivas, G., & Pérez, T. M. (2016). The *Dermacentor* (Acari, Ixodida, ixodidae) of Mexico: Hosts, geographical distribution and new records. *ZooKeys*, 2016(569), 1–22.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.569.7221>
- Harrus, S. (2015). Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The Veterinary Journal*, 204(3), 239–240.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.027>
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, 187(3), 292–296.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- Hofhuis, A., Harms, M., Bennema, S., Van Den Wijngaard, C. C., & Van Pelt, W. (2015).

- Erratum: Physician reported incidence of early and late Lyme borreliosis (Parasites and Vectors (2015)). *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0990-3>
- Hudman, D. A., & Sargentini, N. J. (2016). Detection of *Borrelia*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* spp. in ticks in northeast Missouri. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.010>
- Ismail, N., & McBride, J. W. (2017). Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 37(2), 317–340. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.006>
- Johnson, E. M., Ewing, S. A., Barker, R. W., Fox, J. C., Crow, D. W., & Kocan, K. M. (1998). Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 74(2–4), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00073-3)
- Jones, E. O., Gruntmeir, J. M., Hamer, S. A., & Little, S. E. (2017). Temperate and tropical lineages of brown dog ticks in North America. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 7, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.01.002>
- Kordick, S. K., Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Southwick, K. L., Colitz, C. M., Hancock, S. I., ... MacCormack, J. N. (1999). Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2631–2638.
- Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J. I., Margos, G., Fish, D., & Ogden, N. H. (2006). Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9), 660–669. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1475>
- Levin, M., Gray, J., Dantas-torres, F., & Estrada-pe, A. (2013). Ticks and Tick-borne Diseases Systematics and ecology of the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus*, 4, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>

- Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004>
- McBride, J. W., & Walker, D. H. (2011). Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13(January), e3. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001730>
- Mitchell, E. A., Williamson, P. C., Billingsley, P. M., Seals, J. P., Ferguson, E. E., & Allen, M. S. (2016). Frequency and Distribution of Rickettsiae, Borreliae, and Ehrlichiae Detected in Human-Parasitizing Ticks, Texas, USA, 22(2).
- Moreira-Soto, A., Carranza, M. V., Taylor, L., Calderón-Arguedas, O., Hun, L., & Troyo, A. (2016). Exposure of dogs to spotted fever group rickettsiae in urban sites associated with human rickettsioses in Costa Rica. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 748–753. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.007>
- Moutailler, S., Moro, C. V., Vaumourin, E., & Michelet, L. (2016). Co-infection of Ticks : The Rule Rather Than the Exception, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>
- Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2015). Tick microbiome : the force within. *Trends in Parasitology*, 31(7), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010>
- Nicholson, W. L., Allen, K. E., Mcquiston, J. H., Breitschwerdt, E. B., & Little, S. E. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, 26(4), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007>
- Nunes, M., Parreira, R., Maia, C., Lopes, N., Fingerle, V., & Vieira, M. L. (2016). Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.008>
- Otranto, D., Huchet, J. B., Giannelli, A., Callou, C., & Dantas-Torres, F. (2014). The enigma of the dog mummy from Ancient Egypt and the origin of “*Rhipicephalus sanguineus*.”

Parasites and Vectors, 7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-2>

Peniche-Lara, G., Jimenez-Delgadillo, B., & Dzul-Rosado, K. (2015). *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia felis* infection in *Rhipicephalus sanguineus* ticks and *Ctenocephalides felis* fleas co-existing in a small city in Yucatan, Mexico. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 422–424. <https://doi.org/10.1111/jvec.12185>

Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>

Pérez, T. M., Guzmán-cornejo, C., Montiel-parra, G., & Gerardo, R. P. (2014). Biodiversidad de ácaros en México Biodiversity of Acari in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 399–407. <https://doi.org/10.7550/rmb.36160>

Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S. V., & Petney, T. N. (2013). The ecology of tick-borne diseases. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 1059–1077. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.009>

Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F., Respicio-, L. B., Davis, J. P., ... Petersen, J. M. (2016). Descriptive Study, 16(5), 556–564. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00464-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00464-8). Identification

Raele, D. A., Galante, D., Pugliese, N., Salandra, G. La, & Cafiero, M. A. (2017). Spotted fever group rickettsiae associated with ixodid ticks in wild environment in Southern Italy. *MicrobiologyOpen*, (April), e00527. <https://doi.org/10.1002/mbo3.527>

Rar, V., & Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1842–1861. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.019>

Reuben Kaufman, W. (2010). Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen

- transmission. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1(1), 11–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.12.001>
- Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V., Gutiérrez, R., Yasur-Landau, D., & Baneth, G. (2014). Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Veterinary Parasitology*, 199(3–4), 121–128.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Scorpio, D. G., Wachtman, L. M., Tunin, R. S., Barat, N. C., Garyu, J. W., & Dumler, J. S. (2008). Retrospective Clinical and Molecular Analysis of Conditioned Laboratory Dogs (*Canis familiaris*) with Serologic Reactions to *Ehrlichia canis* , *Borrelia burgdorferi* , and *Rickettsia rickettsii*, 47(5), 23–28.
- Shipov, A., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T., & Harrus, S. (2008). Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 153(1–2), 131–138.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.009>
- SINAVE. (2015). Boletín epidemiológico, 15. Retrieved from
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem01.pdf>
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Caffrey, C. R., Mareš, M., & Kopáček, P. (2013). New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology*, 29(6), 276–285.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.002>
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F. (2003). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379, 461–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7)

- Tinoco-Gracia, L. (2011). Prevalencia y factores de riesgo. *Test.Elsevier.Es*, 12–16. Retrieved from <http://test.elsevier.es/ficheros/sumarios/1/60/1376/40/1v60n1376a10022298pdf001.pdf>
- Troughton, D. R., & Levin, M. L. (2007). Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44(5), 732–40. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.732>
- Vasquez-Espinoza, R., Beck, D. L., & Beck, D. L. (2015). Detection of *Borrelia* and *Ehrlichia* in *Rhipicephalus Sanguineus*. *Fine Focus* 1(2), 110-120.
- Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Tesouro, M. Á., & Sainz, Á. (2015). Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 204(3), 263–8. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.031>